

KONJONKTİVİTLİ OLGULARDA ADENOVİRUS SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASLIHAN BEKÇİ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
AĞUSTOS-2018**

KONJONKTİVİTLİ OLGULARDA ADENOVİRUS SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASLIHAN BEKÇİ

MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

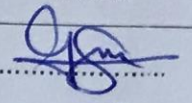
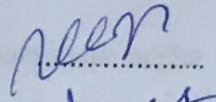
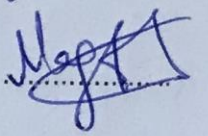
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. SEDA TEZCAN ÜLGER

MERSİN
AĞUSTOS-2018

ONAY

Aslıhan BEKÇİ tarafından Doç. Dr. Seda TEZCAN ÜLGER danışmanlığında hazırlanan "Konjonktivitli Olgularda Adenovirus Sıklığının Araştırılması" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 28 Ağustos 2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Gönül ASLAN	
Üye	Doç. Dr. Seda TEZCAN ÜLGER	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Toğrul NAĞİYEV	

Yukarıdaki Jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ²⁶⁰⁹.../.../2018 tarih ve ⁴⁰³.... Sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

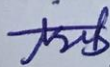
- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific thics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of there ferred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

28 Ağustos 2018 / 28 August 2018



İmza / Signature

Aslıhan BEKÇİ

ÖZET

KONJONKTİVİTLİ OLGULARDA ADENOVİRUS SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Adenovirüsler, hemen hemen tüm yaş gruplarında üst ve alt solunum yolu (AST) enfeksiyonu, konjonktivit, keratokonjonktivit, hemorajik sistit ve gastroenterit gibi çeşitli hastalıklara neden olan zarfsız DNA viruslarıdır. Virusun patojenitesi virus genotipine göre değişkenlik göstermektedir. Özellikle yenidoğan, çocuk ve bağışıklık sistemi baskılanmış olan hastalarda daha ciddi, hatta bazen ölümcül enfeksiyonlar ortaya çıkabilir. Okuler hADV (Human Adenovirus) enfeksiyonları ise epidemik keratokonjonktivit, faringokonjonktival ateş ve non-spesifik foliküler konjonktivit gibi çeşitli klinik görünümüne sahiptir. Konjonktivite sebep olan hADV genotipleri ise coğrafi dağılıma göre değişkenlik göstermektedir. Ülkemizde ise okuler adenovirus enfeksiyonları ve genotip dağılımı ile ilgili oldukça sınırlı veriler bulunmaktadır. Şimdiye kadar da Mersin bölgesinde konjonktiviti olgularda hADV'lerin epidemiyolojik olarak gösterilmesine yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Çalışmada, Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Göz Polikliniğine gelen klinik olarak viral konjonktivit tanısı konulan hastalardan alınan konjonktival sürüntü örneklerinde, hADV varlığının moleküler olarak araştırılarak sıklığının belirlenmesi ve filogenetik analizi yapılarak genotiplerinin belirlenmesi amaçlandı.

Bunun için Eylül 2014 - Aralık 2015 tarihleri arasında adenoviral konjonktivit düşünülen 60 hastadan konjonktival sürüntü örneği alındı. Sürüntü örneklerinden High Pure Viral Nukleic Acid Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ile DNA izolasyonunu takiben hADV DNA'sının tespiti için, hADV genomunun heksogen bölgesini hedefleyen spesifik primer dizileri kullanılarak PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) amplifikasyonu gerçekleştirildi. hADV genotiplerinin belirlenmesi için ise heksogen ürünlerinin direkt DNA dizi analizi "ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) cihazında gerçekleştirildi. Elde edilen hADV DNA dizilerinin BLAST analiziyle genotiplendirilmesi yapıldı ve belirlenen genotipler NCBI (National Center for Biotechnology Information) referans hADV dizileri ile filogenetik olarak karşılaştırıldı.

Çalışma sonunda toplam 60 örnekten 26'sı (%43) hADV DNA pozitif bulundu. Toplam 5 hADV genotipi belirlendi ve en sık görülen hADV genotipi %58,3 oran ile hADV-8 olup, bunu hADV-53 (%16,7), hADV-4 (%16,7), hADV-37 (%4,2) ve hADV-7 (%4,2) izlemektedir.

Sonuç olarak, çalışma popülasyonunda heksogeni PZR'ı ile belirlenen adenoviral konjonktivitin prevalansı dünyanın diğer bölgelerinde bildirilen prevalans oranına benzerdir. Çalışma sonunda predominant genotip %58,3'lük oran ile hADV-8 olarak belirlendi. Adenoviral konjonktivit aşırı bulaşıcı olan bir hastalık olduğu için tedavide temel yaklaşım bulaşmayı önlemeye yönelik olmalı ve kişisel hijyene dikkat edilmesine dikkat çekilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar konjonktiviti olgularda hADV genotiplerinin moleküler epidemiyolojisine büyük katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Adenovirus, Konjonktivit, Epidemiyoloji, PZR, DNA Dizi Analizi, Prevalans, Genotip

Danışman: Doç.Dr. Seda TEZCAN ÜLGER, Mersin Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ADENOVIRUS FLUCTUATION IN CONJUNCTIVITIS CASES

Human adenoviruses are non-enveloped DNA viruses causing various infections such as, upper and lower respiratory tract infections, conjunctivitis, keratoconjunctivitis, hemorrhagiccystitis, andgastroenteritis. Their pathogenicity varies dependent on virus species and type. Sometimes fatal infections may have been emerged especially in newborns, children and immune compromised patients. Ocular hADV infections are sectioned epidemic keratoconjunctivitis, faringokonjonktival fever and non-specific follicular conjunctivitis has various clinical manifestations. hADV genotypes that cause conjunctivities vary according to geographical distribution. In our country, there are very limited data on the ocular adenovirus infection and genotype distribution. Up to now, no study has been conducted on the epidemiological demonstration of hADV in conjunctivitis in the Mersin region.

In the study, it was aimed to determine the genotypes of the conjunctival swab specimens taken from patients diagnosed with viral conjunctivitis from Mersin University Health Research and Practice Hospital Eye Polyclinic by molecular investigation of the presence of hADV and phylogenetic analysis.

A sample of 60 conjunctival swabs adenoviral conjunctivitis was taken between September 2014 and December 2015 for this. Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification was performed using specific primer sequences targeting the hexogen region of the hADV genome for the detection of hADV DNA following DNA isolation with the High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics Gmbit Manheim, Germany) from swab samples. For the identification of AdV genotypes, direct DNA sequence analysis of the hexon gene products was performed on the "ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The resulting hADV DNA sequences were genotyped by BLAST analysis and the determined genotypes were phylogenetically compared to NCBI (National Center for Biotechnology Information) reference hADV sequences.

At the end of the study, 26 (43%) of 60 samples were positive for hADV DNA. A total of 5 hADV genotypes were identified and the most frequent hADV genotype was hADV-8 with a rate of 58,3%, which was followed by hADV-53 (16,7%), hADV-4 (16,7%), hADV- 37 (4,2%) and hADV-7 (4,2%).

In conclusion, the prevalence of adenoviral conjunctivitis determined by hexon gene PCR in the study population is similar to the prevalence rate reported in other parts of the world. At the end of the study, the predominant genotype was determined as hADV-8 with a ratio of 58,3%. Because adenoviral conjunctivitis is a highly contagious disease, the main approach in treatment should be to prevent contamination and to pay attention to personal hygiene. These results will contribute greatly to the molecular epidemiology of hADV genotypes in conjunctival cases.

Keywords: Adenoviruses, Conjunctivitis, Epidemiology, PCR, DNA Sequencing, Prevalance, Genotype

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Seda TEZCAN ÜLGER, Mersin University, Department of Medical Microbiology, Mersin-TURKEY.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince, her konuda yardım ve desteğini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, görüşleriyle beni yönlendiren, başta Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN ve danışman hocam Sayın Doç. Dr. Seda TEZCAN'a;

Yüksek lisans eğitimim süresinde emeği geçen, destek ve yardımlarını gördüğüm değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Prof. Dr. Nuran DELİALİOĞLU ve Sayın Prof. Dr. Feza OTAĞ'a;

Tez çalışmam süresince örnek toplamamda büyük yardımı olan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Ayça YILMAZ'a;

Tezimin bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Didem OVLA ÇELİKCAN'a;

Tez çalışmam sırasında laboratuvar ortamında sonsuz desteklerini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'mızda görev yapan tüm arkadaşlarıma;

Teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da beni manevi açıdan sürekli olarak destekleyen eşime ve aileme;

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ETHICAL DECLARATION.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	Error! Bookmark not defined.i
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xii
1. GİRİŞ	1
2.KAYNAK ARAŞTIRMALARI.....	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Sınıflandırma	3
2.3. Adenovirusun Genomik Yapısı	4
2.4. Adenovirusun Replikasyonu.....	6
2.5. Patogenez.....	7
2.6. Neden olduğu Hastalıklar ve Klinik Bulgular	8
2.6.1 Göz enfeksiyonları	9
2.6.1.1. Spesifik Olmayan Foliküler Konjonktivit.....	9
2.6.1.2. Epidemik keratokonjonktivit	9
2.6.1.3 Faringokonjonktival ateş.....	10
2.6.2. Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonları.....	10
2.6.3 Solunum Sistemi Enfeksiyonları.....	10
2.6.4. Genitoüriner Sistem Enfeksiyonları.....	11
2.6.5. Miyokardit.....	11
2.6.6. Hepatit.....	11
2.7. Epidemiyoloji	11
2.8. Laboratuvar Tanı	12
2.8.1 Klinik Örnekten Direkt Tanı	13
2.8.1.1 Elektron Mikroskopi	13
2.8.1.2 Antijen Belirleme Yöntemi	14
2.8.1.3 Moleküler Yöntemler	15

2.8.2 Hücre Kültürü	16
2.8.3 Tip Tayini.....	17
2.8.4 Serolojik Yöntemler	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM	19
3.1. Örneklerin Toplanması	19
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	19
3.2.1. Kullanılan Cihazlar	19
3.2.2. Kullanılan Kimyasallar	20
3.2.3. Kullanılan Hazır Ticari Kitler	20
3.2.4. Kullanılan Tampon Çözeltiler	211
3.2.4.1. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar	21
3.3. Sürüntü Örneklerinden hADV DNA' nın Tespit Edilmesi	21
3.3.1. Konjonktival sürüntü örneklerinden DNA Ekstraksiyonu.....	21
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulaması	23
3.3.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi	24
3.4. hADV Tiplendirilmesi.....	25
3.5. Filogenetik Analiz	25
3.6. İstatistiksel Analiz	26
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	27
4.1. Bulgular.....	27
4.1.1. PZR Sonuçları.....	27
4.1.2. Filogenetik Analiz Sonuçları.....	28
4.2. Tartışma.....	30
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	36
KAYNAKLAR.....	37
ÖZGEÇMİŞ.....	37

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Adenovirus genotipleri ve klinik enfeksiyonlarla ilişkisi	4
Tablo 2.2. Adenovirus genomu üzerindeki farklı bölgeler, ürünleri ve görevleri	6
Tablo 3.1. hADV "hekzogen" bölgesinin PZR amplifikasyonunda kullanılan primerlerin oligonükleotid dizileri.....	23
Tablo 3.2. ADV genomununun hekzogen bölgesinin amplifikasyonunda her bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışımı	24
Tablo 3.3. Uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri.	24
Tablo 4.1. hADV pozitif örneklerin aylara göre dağılımı	28
Tablo 4.2. Hekzogen PZR pozitif örneklerin DNA dizi analizi belirlenen hADV tipleri.....	28
Tablo 4.3. hADV pozitif bulunan örneklerin aylara göre DNA dizi analizi sonuçları	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Adenovirusun yapısı	5
Şekil 2.2. hADV'lerin hücre içine girişi ve replikasyonu	7
Şekil 2.3. İmmun elektron mikroskopi ile insan gözyaşında adenovirus	14
Şekil 4.1. hADV-PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	27
Şekil 4.2. 24 hasta ve 5 NCBI veritabanı hADV heksogen bölgesinin, “neighbor-joining” karşılaştırma yöntemi ile oluşturulmuş filogenetik ağaç.....	29



KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
AHK	Akut hemorajik konjonktivit
ASY	Alt solunum yolu
bç	Baz çifti
CAR	Coxsackie-Adenovirus reseptörleri
CPE	Sitopatik etki
DFA	Direkt floresan antikor
DNA	Deoksiribonükleik asit
EIA	Enzim immunoassay
EKC	Epidemik keratokonjonktivit
EM	Elektron mikroskobi
gr	Gram
hADV	Human Adenovirus
HAI	Hemaglutinasyon inhibisyon
HEK	Primer insan embriyonik böbrek hücre kültürü
HeLa	İnsan servikal kanser hücre kültürü
HEp-2	Epidermoid karsinom hücre kültürü
HIV	Human immunodeficiency virus
IC	İmmünokromatografi
IEM	immün elektron mikroskopisi
IF	İmmünofloresan
Kb	Kilobaz
KBD	Kompleman birleşme deneyi
mg	Miligram
MHC	Major histocompatibility complex
ml	Mililitre
MLP	Güçlü majör geç promoteri
µL	Mikrolitre
mRNA	Messenger RNA
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pTP	Prekürsör terminal protein
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
RE	Restriksiyon endonükleazlar
REA	Restriksiyon enzim analizi

Kısaltma/Simge	Tanım
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
rpm	Rotation per minute
SYE	Solunum yolu enfeksiyonu
TNF	Tümör nekrozis faktör
UV	Ultraviyole
ÜSY	Üst solunum yolu



1. GİRİŞ

Adenoviruslar, *Adenoviridae* ailesinde *Mastadenovirus* cinsine ait ikozahedral simetrik, zarfsız, çift-zincirli DNA viruslarıdır [1]. Adenoviruslar yedi alt grupta (A-G) incelenir [2] ve ortak antijenik determinanta sahip 50'den fazla genotipinin olduğu bilinmektedir [3, 4]. Tüm yaş gruplarında üst ve alt solunum yolu enfeksiyonu, konjonktivit, keratokonjonktivit, hemorajik sistit, hepatit, miyokardit ve gastroenterit gibi bir dizi hastalığa neden olabilmektedir [3]. Özellikle yenidoğan, çocuk ve bağışıklık sistemi baskılanmış olan hastalarda daha ciddi, hatta bazen ölümcül enfeksiyonlar ortaya çıkabilmektedir [2].

Adenoviruslar, dünya genelindeki tüm konjonktivit olgularının %15-70'ini temsil ederek konjonktivitin önemli nedenlerinden biri olmuştur [5]. Okuler adenoviral enfeksiyonun en yaygın bulgusu epidemik keratokonjonktivit (EKC) ve bunu takip eden faringokonjonktival ateştir [3]. Adenovirus genotiplerinin yaklaşık 1/3'ünün, adenoviral göz enfeksiyonlarının yaygın formları ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. Adenovirus 8, 19 ve 37 genotipleri sıklıkla EKC ile ilişkili olup, hADV-2, -3, -4, -5, -7, -10, -11, -21, -22, -29 ve -34 gibi diğer genotipler de bu hastalık ile ilişkilidir [4]. Faringokonjonktival ateş, genel olarak, çocukları etkileyen ve genotipleri hADV-3 ve -7 olan bir hastalık iken; spesifik olmayan foliküler konjonktivit en yaygın olarak genotip 1-11, -15, -16, -17, -19, -20 ve -22 ile ilişkili bulunmuştur [5]. Bu klinik formların dışında daha çok Coxsackievirus ve Enterovirus'un; daha az sıklıkta hADV tip 11' in sebep olduğu akut hemorajik konjonktivit (AHK) bulunmaktadır. AHK, çok bulaşıcı olan ve salgınlara sebep olan konjonktivit çeşididir [6].

Adenoviruslar özellikle sonbahar ve kış aylarında konjonktivit olgularının %20'sinden sorumlu tutulmaktadır [7]. Taşınma şekli esas olarak ellerin göze teması, okuler sekresyonlar, solunum damlacıkları ve oftalmik bakım hizmeti verenler ve onların kullandığı tıbbi aletler yolu ile olmaktadır. Adenoviral konjonktivit bifazik bir hastalık olup, virusun yayılmaya başladığı enfeksiyonun başlangıcındaki infektif fazı takiben 7-10 gün sonra başlayan inflamatuvar faz ile devam etmektedir. Hasta 2-3 haftaya kadar enfeksiyöz kalmaktadır [3].

Adenoviral konjonktivit tanısı genellikle kliniğe dayalıdır [7]. Laboratuvar tanıda, viral kültür, antijen tespiti, seroloji ve nükleik asit tespiti gibi çeşitli yöntemler kullanılabilir. Nükleik asit tespiti diğer virolojik yöntemlerden daha duyarlı olup ve canlı virusun bulunmasına ve kültürde yaklaşık olarak enfekte olan hücre sayısına bağlı değildir. Bu sebeple, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), viral konjonktivitlerin tanısı için "altın standart" olarak kabul edilmiştir [4].

Adenoviruslar konjonktivitin en yaygın nedeni olup, olgularda hADV sıklığı ve genotip dağılımı virusun coğrafi dağılımına göre değişkenlik göstermektedir. Çalışmada, Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Göz Hastalıkları Polikliniğine başvuran

ve klinik olarak viral konjonktivit tanısı konulan hastalardan alınan konjonktival sürüntü örneklerinde, hADV varlığının moleküler olarak araştırılarak sıklığının belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Tarihçe

Çocuklarda solunum yolu enfeksiyon etkenleri araştırıldığı dönem 1950'li yıllarda başlamıştır [9]. Rowe ve arkadaşları 1953 yılında, adenoid dokudan hücre kültürü hazırlamış ve hADV'leri ilk kez izole etmişlerdir. İkinci olarak Hilleman ve Werner 1954'te, bir askeri birlikte solunum sistemi hastalığı olan askerlerden adenovirusu izole etmişlerdir. Daha sonra bu iki virus birbirleri ile ilişkili bulunmuştur [10]. Enders 1956 yılında, adenoid dokudan elde edilen bu virusa adenovirus ismini önermiş ve kabul edilmiştir [11]. Daha çok göz enfeksiyonları araştırmaları sırasında 1950'lerin sonuna kadar 24 adenovirus genotipi belirlenmiştir [9].

2.2. Sınıflandırma

Adenoviridae ailesi; *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Siadenovirus* olarak 4 cinse ayrılır. Adenoviruslar, *Adenoviridae* ailesi *Mastadenovirus* cinsinde yer almaktadır. *Mastadenovirus* cinsi, latince 'mastos' (meme) kelimesinden türemiştir. *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus* cinsinde bulunanlar insanların içinde bulunduğu memeliler ve kuşlarda görülmektedir. *Atadenovirus* cinsi genomunda yüksek oranda adenin ve timin içerdiği için bu şekilde adlandırılmıştır. *Siadenovirus* cinsi ise sialidaz homolog geni olarak varsayılan genin tanımlanması ile bu adı almıştır [12]. *Atadenovirus* ve *Siadenovirus* cinsinde bulunanlar sürüngenler ve geniş getirenler de dahil olmak üzere daha geniş çapta konakta bulunma özelliğindedirler [13].

Adenoviruslar yedi alt grupta (A-G) incelenir [2] ve ortak antijenik determinanta sahip 50'den fazla genotipinin olduğu bilinmektedir [3, 4]. Bu türlerin ayrımı; DNA yapısı, genom büyüklüğü, onkojenik özellikleri, hemagglütinasyon ve nötralizasyon özelliklerine göre yapılmıştır [14].

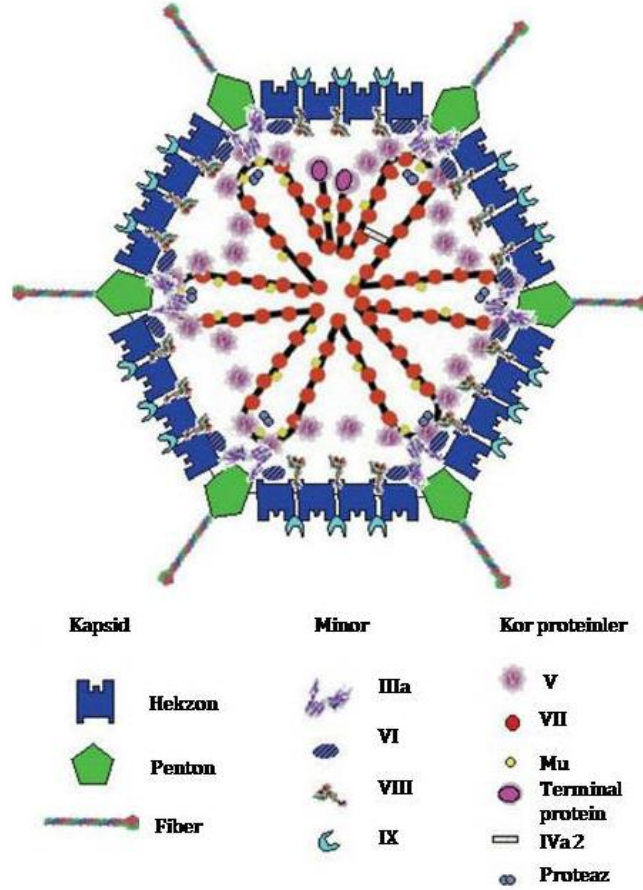
Tablo 2.1. Adenovirus genotipleri ve klinik enfeksiyonlarla ilişkisi [15]

HAdV subgrup	Genotip	Enfeksiyon türleri
A	12, 18, 31	Sindirim, solunum, üriner
B, tip 1	3, 7, 16, 21	Keratokonjonktivit, sindirim, solunum, üriner
B, tip 2	11, 14, 34, 35	Sindirim, solunum, üriner
C	1, 2, 5, 6	Solunum yolu, sindirim içeren hepatit, üriner
D	8-10,13,15,17,19,20,22-30,32,33,36-39,42-49	Keratokonjonktivit, sindirim
E	4	Keratokonjonktivit, solunum
F	40, 41	Sindirim
G	52	Sindirim

2.3. Adenovirusun Genomik Yapısı

Adenoviruslar, insan dokularının çeşitli bölgelerinde enfeksiyona neden olan zarfsız, çift sarmallı DNA viruslarıdır. Adenovirusların çapı 65-80 nm arasında değişmektedir. Adenoviruslar, 252 kapsomerden oluşan bir protein kapsid, DNA viral genomu 26-46 kilobaz [kb] uzunluğunda ve 23-46 protein kodlama genleri bulunan bir nükleoprotein çekirdek ve internal proteinlerden oluşmaktadır. Kapsid, yüzeyinde 240 hekzon bileşenleri ve köşelerde 12 penton bileşenlerinden oluşan ikozahedral bir simetriye sahiptir [14].

İkozahedral kapsid toplam 20 eşkenar üçgenden oluşmaktadır. Hekzonlar eşkenar üçgenlerin yüzeylerini oluşturlar, pentonlar ise köşelerde yerleşmiş halde bulunmaktadır [14]. Hekzonların insan adenoviruslarında ortak olan antijenik yapıları bulunmaktadır. Penton kapsomerleri ise tipe özgül antijeniteyi verir ve virusun hücre kültüründe oluşturduğu erken sitopatik etkiye sahiptir [16]. Pentonların her birinde birer adet penton bazı ve bu baza bağlı birer uzantı halinde fiber yapı bulunur. Fiber antijeninin uzunluğu tiplere göre farklılık göstermektedir [15]. Fiber ve penton bazı birlikte konak hücreleri ile viral kapsid arasındaki etkileşimden sorumlu tutulmaktadır [17].



Şekil 2.1. Adenovirusun yapısı [18]

Adenovirusların toplamda, 11 virion proteini bulunmaktadır. Bunlar; II, III, IIIa, IV, V, VI, VII, VIII, IX, mu ve terminal proteinden oluşmaktadır [18]. Bu proteinlerin yedisi kapsidde bulunmaktadır. Bol miktarda hekzon proteini içermektedir ve polipeptit II'den oluşmaktadır. En bol bulunan ikinci protein penton olup polipeptid IV ve polipeptidin III'ten oluşmaktadır. Penton bazı IIIa'dan oluşurken, hekzon bazı ise stabil bir yapı oluşturmak için VI, VIII ve IX proteinlerinden destek almaktadır [19].

Diğer 4 protein, viral kapsidin çevrelemekte olduğu kor yapısını oluşturmaktadır. V, VII ve mu kor yapısını oluşturur ve DNA için histon benzeri merkez olarak görev almaktadır. Polipeptid V kor ve kapsidini stabilize etmek için pentona bağlanabilmektedir. Terminal protein viral DNA uçlarına bağlıdır ve DNA replikasyonu için primer olarak görev yapmaktadır [19]. DNA viral genomu 26-46 kb uzunluğunda ve 23-46 arası virion içererek virusa özgül protein kodlamaktadır [15]. Adenovirus genotip 2, 5 ve 7'nin tamamen, diğer genotiplerin ise kısmen DNA dizilim verileri mevcuttur. Viral DNA replikasyonu öncesinde genomun 5 farklı bölgesinden erken mRNA'lar sentezlenir [19].

Tablo 2.2. Adenovirus genomu üzerindeki farklı bölgeler, ürünleri ve görevleri [19]

Gen ürünü	Görevleri
E1A	Hüresel transformasyon ve onkojeniteden sorumludur. Viral ve bazı konakçı hücre genleri için transaktivatör özelliğindedir.
E1B	Viral geç mRNA transportunu sağlar. Hüresel mRNA'nın sitoplazmaya ulaşmasını engellemede etkilidir.
E2A	Replikasyon için gerekli olan DNA-bağlayıcı bir proteinin sentezinde görev almaktadır.
E2B	DNA polimeraz sentezinde rol almaktadır.
E3	Makrofajlarda MHC polipeptidlerinin plazma zarına taşınmasını önlediği ve enfekte hücreleri TNF tarafından lizise karşı korumada etkilidir.
E4	Transformasyonda E1B ürünleri ile birlikte rol almaktadır.

2.4. Adenovirusun Replikasyonu

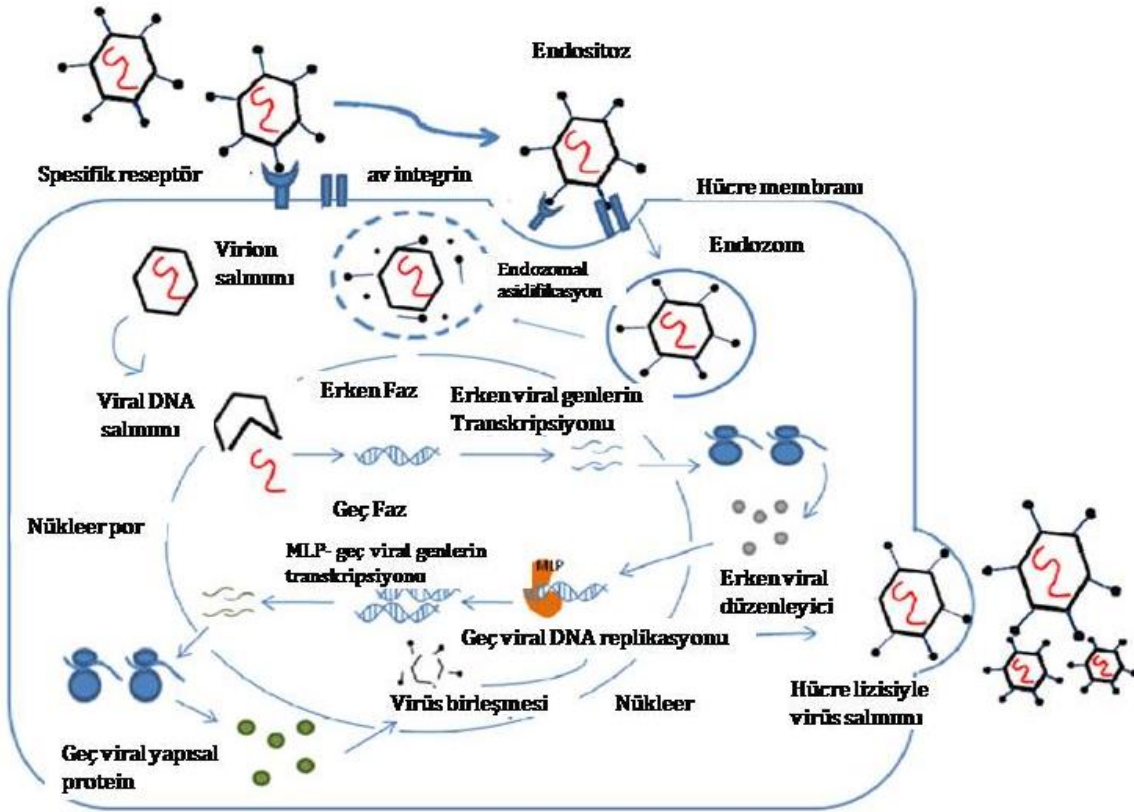
Adenovirusların genotiplerine göre dokulara tropizmi farklılık göstermektedir [9]. İmmüoglobülin üst ailesinin bir üyesi olan ve polarize epitel hücrelerine sıkı birleşme için *in vivo* olarak bulunan adenovirusların çoğu için temel reseptör "coxsackie adenovirus reseptörü" (CAR) olarak adlandırılmıştır. Genel olarak, A, C, E, F ve G türleri CAR reseptörleri ile etkileşime girmektedir. B cinsine ait genotipler CD46 reseptörlerini kullanırken, D cinsine ait genotipler siyalik asit reseptörlerini kullanmaktadırlar [19].

Adenovirus kaynaklı enfeksiyon, virusun hücre yüzeyine özel bir reseptör aracılığıyla bağlanması sonucu başlar. Penton baz, virus girişini stimüle eden yüzey proteini "av integrinler" ile etkileşime girer ve endositoz yolu ile hücreye girer [20]. Endozomun asidifikasyonu ile viral kapsid yapısında endozomal lizis oluşur ve virionlar sitoplazma içine girerler. Viral proteazın aktivitesi ile kapsid soyulma işlemi gerçekleşir ve adenovirus genomu mikrotübüller aracılığıyla nükleusa taşınır. Nükleus içinde virus replikasyonu için viral DNA parçalara ayrılır. Viral DNA replikasyonu erken faz ve geç faz olmak üzere iki fazdan oluşmaktadır [19]. Erken fazda viral DNA replikasyonu, geç fazda ise viral kapsidin yapısal proteinlerinin ekspresyonu gerçekleşir. Erken faz, diğer virus genlerini aktive eden, enfekte olmuş hücrelerin erken ölümünü engelleyen ve DNA sentezi için konak proteinlerinin ekspresyonunu değiştiren düzenleyici protein olarak ifade edilmiştir [20]. Enfeksiyondan kısa bir süre sonra erken viral transkripsiyon üniteleri olan E1A, E1B, E2A, E2B, E3 ve E4 üniteleri aktif hale geçmektedir. E1A proteinleri konak hücrede mitojenik aktiviteyi indükler ve diğer viral genlerin ekspresyonunu uyarır. E1B, enfekte hücreyi adenovirus genlerinin replikasyonu ve transkripsiyonu yönünde uyarmaktadır. E2 proteinleri, viral DNA replikasyonuna aracılık ederken E3 ve E4 proteinleri konakçı bağışıklık tepkilerini ve hücre sinyali değiştirme özelliğine sahiptir [21].

DNA replikasyonu için; adenovirus genomu DNA polimeraz, prekürsör terminal protein (pTP), DNA bağlayıcı protein (DBP) ve nükleer faktör I, II ve III gibi hüresel proteinleri

kodlamaktadır. DNA replikasyonu tek iplikçinin 3' ucundan başlar. DNA sonunda bulunan tekrarlayan diziler ile replikasyon sırasında tek iplikli çembersel DNA oluşur ve çembersel tek iplikli DNA daha sonra sentez sırasında açılarak çift iplikli DNA oluşmaktadır [9].

DNA replikasyonu için bileşenler hazır olduğunda, geç faz devreye girmektedir. Güçlü majör geç promoteri (Major Late Protein-MLP), viral parçacıkların olgunlaşması için, viral yapısal proteinleri ve proteinleri kodlayan geç virus genlerinin transkripsiyonu için aracılık eder. Virionlar enfekte hücrenin nükleusunda agregatlar halinde toplanırlar. Enfeksiyon oluşumundan sonra virus, viral kaynaklı hücre lizisi vasıtasıyla diğer hücreleri enfekte etmek için serbest kalır [20].



Şekil 2.2. Adenovirusların hücre içine girişi ve replikasyonu [20]

2.5. Patogenez

Adenoviruslar insan hücrelerini iki şekilde etkileyebilir. Epitel hücrede bulunan litik bir enfeksiyonda, virus hücre içindeki replikasyon döngüsünü tamamlar, %5'e kadar enfeksiyona sahip olan 10^4 ila 10^6 yeni virus salınır ve hücre ölüm başlar. Lenfoid hücrelerde ise latent enfeksiyona neden olur ve bu hücrelerden sadece az miktarda virus salınımı gerçekleşir.

Adenoviral enfeksiyona karşı immün yanıt, inokülasyon bölgesi, genotip ve konağın bağışıklık durumu gibi bir dizi faktöre bağlıdır.

Adenovirusların, enfekte hücrelerde intrinsik hücresel apoptozun inhibisyonu, interferon ve tümör nekroz faktörüne karşı tepkilerin inhibisyonu ve hücre yüzeyleri üzerinde MHC 1 (Majör Doku Uygunluk Kompleksi 1) ekspresyonunun önlenmesi dahil olmak üzere konakçı immün yanıtını antagonize etmek için birkaç mekanizması bulunmaktadır [3].

Çoğu adenovirus türü dünya çapında yaygındır ancak baskın türler ülkeler veya coğrafi bölgeler arasında farklılık göstermektedir ve dağılımları zamanla değişebilmektedir [22, 23]. Adenoviruslar dünyada yaygın olarak insan enfeksiyonlarında hADV-C1, -C2, -C5, -B3, -B7, -B21, -E4 ve -F41 grupları bulunmaktadır. Organ transplantasyonu ile immün sistemi baskılanmış hastalarda, bazı tipler daha çok öne çıkmaktadır. Bunlar; hADV-C1, -C2, -C5, -A12, -A31, -B3, -B11, -B16, -B34 ve -B35' tir [23]. En yaygın okuler morbiditeye neden olan adenoviral keratokonjonktivit türlerinden hADV-D, tip-8, -19 ve -37 ve hADV-E4, -C5, -B3, -B7, -B11 ve -B14 tipleri görülmektedir [23]. Adenoviruslar; göz, solunum, intestinal ve genitoüriner sistem organlarının yüzeyel hücrelerini enfekte ettiği için epitelyal hücrelere tropizmi olduğu anlaşılmaktadır [2].

Enfeksiyonun inkübasyon süresi konağın cevabı, bulaşın yolu, AdV tip ve dozuna, viral lokalizasyon yerine göre genellikle 2 gün ile 2 hafta arasında değişmektedir [23]. İnsanlarda adenovirusun onkogenik dönüşümü destekleyen kesin bir kanıt yoktur [3].

2.6. Neden Olduğu Hastalıklar ve Klinik Bulgular

Virusun yayılımı solunum yolu veya fekal/oral yol ile olmaktadır. Adenovirus enfeksiyonları bütün mevsimlerde görülür ve özellikle okul çağındaki çocuklarda olmak üzere bütün yaş gruplarında endemiktir [7]. Adenovirus enfeksiyonunun çoğu asemptomatiktir. Ancak 5 yaşın altındaki çocukların %5'inde akut solunum sistemi enfeksiyonu gelişmektedir. Bazı genotipler gastroenterite sebep olabilmektedir. Enfekte olan çocukların yaklaşık yarısında virus tonsiller dokuda latent olarak yerleşebilmektedir [9]. Esas olarak solunum yolu, gastrointestinal sistem ve konjonktivada lokalize enfeksiyon oluştururlar. Farenjitten bronşiolite, krup, pnömoni ve diareye kadar değişen birçok farklı klinik tabloya sebep olurlar [2]. Adenovirus enfeksiyonlarını altı ana başlık altında toplamak mümkündür.

- Göz enfeksiyonları
 - Spesifik Olmayan Foliküler Konjonktivit
 - Epidemik keratokonjonktivit
 - Faringokonjonktival ateş
- Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonları

- Solunum Sistemi Enfeksiyonları
- Genitoüriner Sistem Enfeksiyonları
- Miyokardit
- Hepatit

2.6.1 Göz enfeksiyonları

Viral konjonktivit önemli sayıda poliklinik hastasıyla sonuçlanan oldukça bulaşıcı bir enfeksiyondur [24]. Yayılım damlacık yolu veya direkt temas ile olmaktadır. Çeşitli klinik formları vardır. Bunlar; faringokonjonktival ateş, EKC ve spesifik olmayan foliküler konjonktivittir [8].

Epidemik keratokonjonktivit genellikle hADV-8, -19 ve -37 tarafından oluşturulmaktadır, faringokonjonktival ateş, genel olarak, çocukları etkilemekte olup hADV-3 ve -7 tarafından oluşturulan bir hastalık iken, spesifik olmayan foliküler konjonktivit en yaygın olarak hADV- 1,-11, -15, -16, -17, -19, -20 ve -22 ile ilişkili olduğu belirtilmektedir [5].

Bu klinik formların dışında daha çok Coxsackievirus ve Enterovirus'un; daha az sıklıkta hADV-11'in sebep olduğu AHK bulunmaktadır. AHK, çok bulaşıcı olan ve salgınlara sebep olan konjonktivit çeşididir [6]. Genellikle belirtiler iki taraflı olmaktadır ve bir gözde daha erken başlayıp diğer göze geçmektedir [7]. Bulaş genellikle enfekte kişi veya kontamine aletlerle temas ile ya da doğrudan temas yoluyla gerçekleşmektedir [25]. Klinik tablo birkaç hafta sürebilmektedir, kornea tutulumu varsa iyileşmesi aylarca devam etmektedir. Adenoviral konjonktivit tanısı genellikle kliniğe dayalıdır [5].

2.6.1.1. Spesifik Olmayan Foliküler Konjonktivit

Spesifik olmayan foliküler konjonktivit, folikül lenfositlerin kümelenmesi ile oluşmaktadır. Folikül kan damarlarının oluşturduğu ağ tarafından çevrelenen damarsız, küçük, soluk alanlar şeklinde görülmektedir. Bu semptomlar dışında preauriküler lenfadenopati, hiperemi, sulu akıntı, göz kapaklarında ödem, rinit, farenjit gibi etkenler görülebilmektedir [25]. Hasta daha çok kaşıntı ve yabancı cisim hissinden yakınmaktadır. Hastada kırmızı göz veya üst solunum yolu enfeksiyonu ile birlikte başka kişi ile temas öyküsü sıklıkla mevcuttur [25, 26].

2.6.1.2. Epidemik Keratokonjonktivit

Epidemik keratokonjonktivitten en sık sorumlu etkenler, hADV -8, -19 ve -37'dir. [26]. Genellikle ileri yaştaki çocuklar ve erişkinlerde görülmektedir. Virusla kontamine olan eşyalar

iki ay boyunca bulaşıcı olabilmektedir [26, 27]. Klinik formu; fotofobi, korneal tutulum, konjonktival ödem, punktal epitelyal defekt, foliküler (erken) veya papiler (geç) yanıt ve küçük peteşiyal kanamaları içeren göz belirtileri yaygındır [26]. Göz kapaklarında ve konjonktivada şişme görülebilmektedir. Şiddetli olgularda enflamatuvar yalancı zar izlenebilmektedir [25].

2.6.1.3 Faringokonjonktival ateş

En sık sorumlu etkenler, hADV-3, -4 ve -7'dir [7, 28]. Salgın daha çok bulaşmış havuzlardan ve az klorlanmış yüzme havuzlarında gerçekleşmektedir [28]. Bulgular; ateş, konjoktival ödem, farenjit, hiperemi ve iki taraflı preauriküler lenfadenopati şeklinde görülebilmektedir. Bazen konjonktivada küçük peteşilere rastlanmaktadır. Belirtilerin düzelmesi 4 gün ile 2 hafta arasındadır [25, 28].

2.6.2. Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonları

Yılda yaklaşık 800.000 kişinin ölümüne yol açan viral gastroenteritlerden adenoviruslar beş yaş altı çocuklarda en sık görülen etkenlerden biridir. En sık etken olan genotipleri hADV-40 ve -41'dir [29]. Fekal-oral yolla bulaş görülmektedir [19]. Diyare genellikle bol sulu, kansız ve lökosit içermemektedir. Hafif ateş, karın ağrısı ve kusma görülebilmektedir. Semptomlar ortalama 10 gün süreyle devam etmektedir [29].

2.6.3 Solunum Sistemi Enfeksiyonları

Adenoviruslar, kış ve ilkbahar aylarında bölgesel solunum yolu enfeksiyonu (SYE) salgınlarına yol açmaktadır [23]. Adenovirusların solunum sistemi enfeksiyonları ASY ve ÜSY olarak ikiye ayrılmaktadır. hADV'lerle ilişkili üst SYE'ler soğuk algınlığı, farenjit ve tonsillit şeklinde görülmektedir ve hADV-1-7 ile ilişkili olduğu görülmektedir. hADV-1, -2, -5 ve -6 ile oluşan enfeksiyonlarda, yaklaşık %50 olguda virusun adenoid ve tonsillar dokuda latent kaldığı belirtilmektedir. Bronşit, bronşiyolit ve pnömoni gibi alt SYE'ları hADV enfeksiyonuna bağlı sık görülen komplikasyonlardır. Özellikle toplu yaşam koşullarında, yenidoğan ünitelerinde salgın şeklinde SYE'larına neden olmaktadır. Özellikle hADV-3, -4, -7 ve -21 tipleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir [29,30]

2.6.4. Genitoüriner Sistem Enfeksiyonları

Genellikle adenoviral enfeksiyonlar çocuklarda (%13,6) yetişkinlere göre (%31-%47) daha sık görülmektedir. Sıklıkla erkek çocuklarda görülebilen akut hemorajik sistit etkeni hADV-1, -4, -7, -11 ve -21' dir. Özellikle immun sistemi düşük olan (transplant hastaları, AIDS'li hastalar gibi) konakçıda latent ve yaygın enfeksiyona neden olmaktadır. hADV-2, -19 ve -37 genital lezyonlardan izole edilmişlerdir [31, 32, 33]

2.6.5. Miyokardit

Miyokard dokusunda nekroz ve miyelositolizis ile birlikte oluşan enflamasyondur. Birçok durumda geliştiği gibi, en sık konjestif kalp yetmezliği ile ortaya çıkmaktadır. En yaygın miyokardit nedeni viruslardır. Bazen hiç klinik bulgu vermeden iyileşebildiği gibi, ani ölümlere sonlanabilmektedir. Küçük yaşlarda akut fulminan seyir daha sık gözlemlenmektedir. Bazen başlangıçta bulgu vermeyerek daha sonra çocukta dilate kardiyomiyopati gelişebilmektedir. En sık etyolojik ajan Coxsackie B ve adenovirus olarak bilinmektedir [34].

2.6.6. Hepatit

Akut hepatite neden olan etkenler viral ve viral olmayanlar olmak üzere iki ana grupta incelenmektedir.

Viral etkenler içinde hepatit A, E, G virusları, transfüzyonla geçen virus, rubella, rubeola, paramiksovirus, parvovirus B19, herpes simpleks virus 1-2, koksaki B virus, ekovirus 14-19, adenovirus, varisella-zoster virus, sitomegalovirus, Epstein-Bar virus, herpes virus-6 ve HIV (Human immun deficiency virus) bulunmaktadır. Adenoviruslar özellikle immun sistemi bozuk olanlarda ağır hepatit ve hepatik nekrozla seyredebilir, hatta fulminan karaciğer yetersizliğine neden olabilmektedir [35, 36].

2.7. Epidemiyoloji

Adenovirusların rezervuarı insanlardır. Özellikle kışla, okul, işyeri ve hastane gibi toplu yaşam koşullarında salgın şeklinde alt ve üst solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır [37]. Tüm yaş gruplarında solunum yolu enfeksiyonu dışında konjonktivit, miyokardit, keratokonjonktivit, hemorajik sistit, hepatit ve gastroenterit gibi bir dizi hastalığa neden olabilmektedir [3]. Özellikle yenidoğan, çocuk ve bağışıklık sistemi baskılanmış olan hastalarda daha ciddi, hatta bazen ölümcül enfeksiyonlar ortaya çıkabilmektedir [2, 7]. Dünya Sağlık

Örgütünün verilerine göre hADV-1, -2, -3, -5 ve -7 ile nedeni ile oluşan enfeksiyonlar tüm adenovirus olguların %90'ından sorumlu tutulmaktadır. hADV-1, -2, -5 ve -6 endemik enfeksiyonlar oluştururken hADV-4, -7, -14 ve -21 ise epidemileri oluşturmaktadır [37]. Adenoviruslar, dünya genelindeki tüm konjonktivit olgularının %15-70 temsil ederek konjonktivitin önemli nedenlerinden biri olmuştur [38].

Adenoviruslar özellikle sonbahar ve kış aylarında konjonktivit olgularının %20'sinden sorum tutulmaktadır [7]. Taşınma şekli esas olarak ellerin göze teması, okuler sekresyonlar, solunum damlacıkları ve oftalmik bakım hizmeti verenler ve onların kullandığı tıbbi aletler yolu ile olmaktadır. Adenoviral konjonktivit bifazik bir hastalık olup, virusun yayılmaya başladığı enfeksiyonun başlangıcındaki infektif fazı takiben 7-10 gün sonra başlayan inflamatuvar faz ile devam etmektedir. Hasta 2-3 haftaya kadar enfeksiyöz kalmaktadır [3].

Adenoviral konjonktivitler, yıl boyunca epidemik veya sporadik şekilde görülebilmektedir. Hastalığın seyri ve şiddeti serolojik alt tiplere bağlı olarak değişmektedir. D tipi hADV-8, -19 ve -37 EKC ile ilişkili olduğu saptanırken; B ve C tipi hADV-3, -5, -7 ve -11 faringokonjonktival ateş kaynaklı; B ve E tipi hADV-1-11'in sıklıkla foliküler konjonktivit kaynaklı olduğu belirtilmiştir [4].

Adenoviral enfeksiyonların bildirilmesi zorunlu olmadığı için; mortalite ve morbidite oranları tam olarak bilinmemektedir. Enfeksiyonun en yüksek görülme sıklığı 2 yaşın altındaki çocuklar olarak belirlenmiştir. Geniş epidemiyolojik çalışmalar incelendiğinde asemptomatik çocuklarda en sık izole edilen viral etken hADV olarak belirlenmiştir [9].

2.8. Laboratuvar Tanı

Adenoviral konjonktivit tanısı genellikle semptom ve klinik bulgulara dayanılarak yapılır.

Adenovirusların tanısında kullanılan yöntemler dörde ayrılır:

1. Klinik örnekten direkt tanı
 - Elektron mikroskopi
 - Antijen belirleme yöntemi
 - Moleküler yöntemler
2. Hücre kültürü
3. Tip tayini
4. Serolojik yöntemler

2.8.1 Klinik Örnekten Direkt Tanı

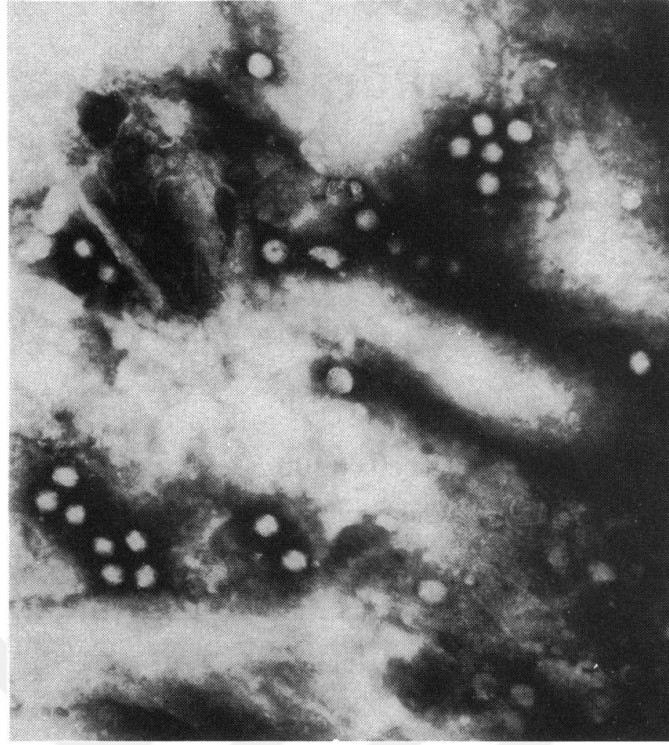
2.8.1.1 Elektron Mikroskopisi

Klinik örnekte adenovirus partikülleri veya hücre çekirdeğinde olgunlaşmış virusların oluşturduğu karakteristik yapılar elektron mikroskopisi (EM) ile saptanarak daha ileri tanımlamaya gerek kalmadan adenovirus tanısı yapılabilmektedir. EM ile incelenecek olan tespit edilmiş doku ince kesitlere ayrılır, negatif boyanır ve çekirdek içinde bulunan virus partiküllerinin kristal dizilimlerine bakılmaktadır [16].

Bu yöntemin duyarlılığı, örnekte bulunan virus partiküllerinin miktarına bağlı olarak değişmektedir. Virusun EM ile saptanabilmesi için örneğin mililitresinde en az 10^5 - 10^6 virus partikülü olması gerekmektedir. Elektron mikroskopisi daha çok akut adenoviral gastroenterit olgularında kullanılmaktadır [9, 39].

Adenoviruslar, EM dışında daha hassas ve özgül olan immün elektron mikroskopisi (IEM) ile de gözlemlenebilmektedir. IEM'de, örnek önce virusa özgül antiserumla muamale edilerek, virus partiküllerinin özgül antikorlar agregate edilmekte ve böylece daha kolay görünmelerini sağlamaktadır. IEM hızlı ve duyarlı bir yöntem olarak okuler hADV enfeksiyonlarının tanısında kullanılması tavsiye edilmektedir [39].

Elektron mikroskopisi ile hızlı bir şekilde adenovirus tanısı konulabilmektedir ancak pratikte kullanımı sınırlı, zahmetli ve pahalı bir yöntem olduğu için çok fazla tercih edilmemektedir. Elektron mikroskopisi günümüzde rutin tanıdan çok araştırma amaçlı tercih edilmektedir [9, 39].



Şekil 2.3. İmmün elektron mikroskobu ile insan gözyaşında adenovirus. (X45 000) [39].

2.8.1.2 Antijen Belirleme Yöntemi

Antijen belirleme yöntemi, daha çok solunum ve gastrointestinal enfeksiyonların tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Adenovirus antijeni, İmmünfloresan (IF) veya enzim immunoassay (EIA) temelli, genellikle ticari olarak elde edilebilen testler kullanılmaktadır. Bu yöntemler genellikle yeterli duyarlılığa sahiptirler ve hızlı sonuç verirler [16]. İmmünfloresan, özellikle solunum örnekleri, sürüntü veya biyopsi örnekleri için kullanılmaktadır. Örnekteki epitel hücreleri lam üzerine çöktürülerek asetonla sabitlenir, işaretli monoklonal antikorlar ile boyanır ve floresan mikroskop ile incelenir [36]. Genellikle daha duyarlı olan direkt floresan yöntemleri tercih edilir. Kültür ile karşılaştırıldığında solunum yolu örneklerinde Direkt Floresan Antikor (DFA) yönteminin duyarlılığı %40-60 arasındadır [16]. Özgüllük birçok çalışmada %99'un üzerinde bildirilmiştir. DFA'nın adenovirusları saptamadaki duyarlılığının kültüre göre çok daha düşük olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle negatif sonuçların kültür ile doğrulanması gerekmektedir [36]. Bunun dışında DFA testinde örneğin kalitesi, virusun türü ve deneyimsiz personel tarafından sonuçların yanlış yorumlanma olasılığında bulunmaktadır [2].

Enzim immunoassay yöntemi özellikle dışkı örnekleri için yaygın olarak kullanılmaktadır. EIA bu virusların tanısında hızlı, basit ve maliyet açısından etkin bir tanı yöntemidir. EIA duyarlılığı, EM ve hücre kültürü ile karşılaştırıldığında genellikle %90'ın üzerindedir ve saçılan virus miktarı 10^{10} partikül/gr dışkı olduğunda yeterli olmaktadır.

Özgüllük ise genellikle %97'dir [40]. Diğer hızlı antijen saptama yöntemleri immünokromatografi (IC) ve lateks aglutinasyon testleridir. Immünokromatografi yöntemi, örneğin membran bir strip boyunca lateral olarak ilerlediği, antijenin virusa spesifik antikorlara bağlanarak birkaç dakika içinde renkli bir çizginin görüldüğü hızlı bir tanı yöntemi olarak tanımlanmaktadır. Yöntemin duyarlılığı %60-70 gibi düşük oranlarda olduğu belirtilmektedir. Duyarlılığı düşük olmasına rağmen lateks aglutinasyon testleri özellikle gaitada enterik adenovirus saptanması için kullanılmaktadır. Bu testlerinin duyarlılıkları, monoklonal antikor kullanılması ile artırılmaktadır [9].

2.8.1.3 Moleküler Yöntemler

Adenovirusların özellikle immun yetmezliği olan hastalarda ve oftalmik enfeksiyonlarında görülen yüksek bulaşıcılık nedeniyle, etkenin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması salgınların önlenmesi veya sonlandırılması bakımından önem taşımaktadır [1].

PZR; diğer tanı yöntemleri ile karşılaştırıldığında hızlı sonuç veren ve yüksek duyarlılığa sahip moleküler yöntemler olduğu için günümüzde sık olarak tercih edilmektedir [4]. Viral yükün çok az olduğu veya az miktarda örnekle çalışıldığı durumlarda bile sonuç vermektedir. PZR yöntemi, viral genomda hedeflenen gen bölgelerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır [9].

İlk başta hedef DNA denatüre edilerek tek sarmalı kalıp olarak kullanılmaktadır. Çoğaltılmak istenen gen bölgesine spesifik oligonükleotid primerleri, *Taq* DNA polimeraz enzimi yardımıyla hedef bölgeye bağlanmakta ve çift sarmallı DNA moleküllerini oluşturmaktadır. Sentezlenen her yeni çift sarmallı DNA molekülü bir sonraki döngüde kalıp görevi görmektedir [41]. PZR yöntemi ile 30 amplifikasyonun sonunda tek bir çift zincirli DNA molekülünden bir milyon kopya üretilebilmektedir. Bu basamakların tekrarlanması sonucunda çoğaltılan ürünler jel elektroforezi, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) veya sekanslama gibi işlemler uygulanabilmektedir [42].

PZR kullanım şekillerine göre sınıflandırılmaktadır. Bunlar; Real-time PZR, Nested PZR, Multipleks PZR olarak gruplandırılmaktadır [41].

Real-time PZR, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede kantitatif sonuç vermektedir. Ayrıca elektroforeze gerek kalmadan amplifikasyon esnasında sonuç verebilmektedir. Nested PZR ile örnekte tek bir hedef DNA molekülü bulursa bile iki aşamalı yapılan amplifikasyonla çok sayıda DNA elde etmek mümkün olmaktadır. Multipleks PZR ile farklı hedef bölgeler için özgül olan primerler kullanılarak çok sayıda hedef aynı zamanda çoğaltılabilmektedir [41].

PZR'ye dayalı yöntemlerin duyarlılığını ve özgüllüğünü; PZR ürününün büyüklüğü, reaksiyon koşulları, primer setleri, çoğaltılan hADV DNA tipi veya reaksiyonda kullanılan DNA polimerazın performansı gibi faktörler etkileyebilmektedir. Bunların yanısıra kontaminasyon sonucu da hatalı pozitif sonuçlar elde edilebilmektedir [43]. Son yıllarda PZR yoluyla DNA amplifikasyonu ile moleküler yöntemlerin kullanıma girmesi, artmış duyarlılık ve hızlı tanıyı sağlamaktadır [42].

2.8.2 Hücre Kültürü

Adenovirusun hücre kültüründe izolasyonu tanıda altın standarttır. Tip 40 ve 41 dışındaki adenoviruslar, epitelyal orijinli devamlı hücre kültürleri olan insan servikal kanser hücre kültürü (HeLa), insan epidermoid karsinom hücre kültürü (HEp-2), primer insan embriyonik böbrek hücre kültürü (HEK) gibi devamlı insan hücrelerinde, insan embriyonik akciğer fibroblastlarında ve diğer embriyonik fibroblastik hücrelerde üreyerek sitopatik etki (Cytopathic effect-CPE) oluşturmaktadırlar [16]. Adenovirus enfeksiyonlarında klinik örneklerin erken dönemde alınması izolasyon şansını artırmaktadır [9].

Adenovirusun tipi, konsantrasyonu ve konak hücre hassasiyeti CPE çıkış hızını etki etmektedir. Klinik örneklerden adenovirusların üretilmesi 2-4 hafta kadar sürmektedir. Adenoviruslarla enfekte hücrelerde virusun çoğalmasına bağlı olarak hücre yuvarlaklaşması, genişlemesi ve üzüm salkımı şeklinde biraraya toplanma, yani agregasyon tipi CPE karakteristiktir. Maymun, insan ve sıçan eritrositleri kullanılarak, aglütinasyon ile subgrup tanısı yapılmaktadır. Hemaglutinasyon inhibisyon testi, nötralizasyon testi, EIA ve PZR ile tip tanısı yapılabilmektedir [44]. Son zamanlarda shell-vial yöntemiyle yapılan hızlı hücre kültürü yöntemi giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır [45].

Shell-vial kültürü, geleneksel hücre kültürü bileşenleri ile antijen tespiti metodlarının kombine edilmiş şeklidir. İnokulasyondan sonra 1-2 gün içinde pozitif kültürlerin büyük bir kısmını tespit ettiği için laboratuvar teşhisinde önemlidir [44]. Bu metod adenovirusların hızlı teşhisinde uygulanabileceği belirtilmiştir [45].

Shell-vial yöntemi; santrifüj ile virus veya virus agregatları hücre yığına tutunabilmekte veya hücre membranından virusun girişini artırma gibi bir etkisinin olabileceği belirtilmektedir [9]. Örnekler, "shell-vial" tüplerinin içindeki yuvarlak lamlar üzerinde üretilmiş hücre kültürlerine ekilir. 24-48 saat sonra lamların şüphelenilen virusa özgül ve floresanlı bir madde ile işaretlenmiş antikolarla (IF yöntemi) boyanarak değerlendirilmektedir [46, 47].

2.8.3 Tip Tayini

Tip tayini daha çok; epidemiyolojik araştırmalarda, patogenezi çalışmalarında, sık rastlanmayan ciddi enfeksiyonların etkeninin araştırılmasında kullanılmaktadır [9].

Tiplendirme; serolojik yöntem ve moleküler yöntem olarak ikiye ayrılmaktadır. Serolojik yöntemler; nötralizasyon, hemaglutinasyon, hemaglutinasyon inhibisyon olarak üçe ayrılır. Nötralizasyon testi, bağışık serumlarda bulunan ve virüsü nötralizasyon eden antikorlar kullanılarak uygulanmaktadır. Virüsün, özgül antikorlar ile üreme özelliklerine göre değerlendirmesi yapılmaktadır. Hücre kültürü veya deney hayvanları kullanılmaktadır. Nötralizasyon testi türe özgül, uygulaması zor ve zaman alıcıdır, fakat nötralizasyon testi serolojik tanıda “altın standart” olarak kabul edilmektedir. Hemaglutinasyon testi, hADV izolatlarının tip spesifik identifikasyonunda grup belirlenmesinde uygulanmaktadır. Daha sonra spesifik genotiplerin belirlenmesinde hemaglutinasyon inhibisyon testleri veya nötralizasyon testleri yapılabilmektedir. Testin yapılabilmesi için hastalığın akut ve konvalesan dönemlerinde alınmış hasta serumlarına, standart bir eritrosit süspansiyonuna ve titre edilmiş standart antijenlere gereksinim duyulmaktadır [44].

Genomik yapı ve genetik dizilim, virus tipleri ve türleri arasında farklılık göstermektedir. Bu farklılığı DNA'nın Restriksiyon endonükleaz (RE)'lar yardımıyla kesimi ile gösterilebilmektedir. Kısa DNA dizilerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilere yakın bölgelerden veya bu diziler içindeki spesifik bölgelerden DNA'yı kesen enzimler RE olarak adlandırılmaktadır. Moleküler yöntemlerde, restriksiyon enzim analizi (REA) ve RFLP ya da “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE) yöntemleri olarak ikiye ayrılmaktadır. Son zamanlarda hADV genotiplerinin ayırımında DNA üzerinde belli tanıma ve kesme bölgeleri olan restriksiyon enzimleri kullanılarak gerçekleştirilen REA kullanılmaktadır [9, 44].

2.8.4 Serolojik Yöntemler

Adenovirus enfeksiyonlarının tanısında; spesifik IgM veya IgG varlığının gösterilmesinde, EIA, hemaglutinasyon inhibisyon (HAI), nötralizasyon ve kompleman birleşme deneyi (KBD) kullanılmaktadır [9].

Kompleman Birleşme Deneyi gruba özgül antikorları saptar ancak genotipe özgül değildir. Ayrıca duyarlılığı düşük olmakla beraber adenovirusların herhangi bir genotipi ile oluşan enfeksiyonda, akut ve konvalesan dönemler arasında antikor titresinde en az dört kat artış anlamlıdır. Nötralizasyon ve HAI testleri ise genotipe özgül sonuç vermektedir. [44].

Serolojik yöntemlerde, bazı durumlarda yanlış negatif sonuçların tespit edilebilmesi ve yanlış pozitif sonuçların saptanabilmesi gibi çeşitli sınırlamalar mevcut olmasına rağmen epidemiyolojik çalışmalar açısından önemini korumaya devam etmektedir [1].



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmaya Eylül 2014 - Aralık 2015 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Göz Hastalıkları Polikliniği'ne konjonktivit ön tanısı ile başvuran ve adenoviral keratokonjonktivit düşünüleni 60 hastadan alınan konjonktival sürüntü örneği dahil edildi. Bunun için steril serum fizyolojik ile ıslatılmış eküvyon, adenoviral konjonktivit ön tanılı hastaların konjonktiva üzerinden çevrilerek, alt konjonktiva kesesinden veya fornikse sürülerek örnekleme yapıldı. Hastalardan alınan sürüntü örneği eküvyon ile birlikte virus taşıma besiyerine alındı. Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na taşıma besiyerinde ulaştırılan örnekler iyice vortekslenerek iki adet 1,5 ml'lik steril plastik tüplere alındı ve çalışılncaya kadar -80°C'de saklandı.

Çalışma Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'nın 26/02/2015 tarihli ve 2015/65 sayılı kararı ile "Etik Kurul Onayı" nı almıştır. Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından "2015-TP2-1089" nolu proje olarak desteklenmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların hepsi, yapılacak çalışma ile ilgili olarak bilgilendirilmiştir.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

- Isı döngü cihazı (Thermal Cycler, Eppendorf Mastercycler Gradient)
- Güvenlik Kabini (Heraeus, HERA safe)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Thermo, EC250-90)
- Elektroforez Tankı (Thermo Scientific, Owl E. Sycast™ B2)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, Fransa)
- "UV-Transilluminatör (UVP, 81.0110.01)
- Mikrodalga Fırın (Beko, MD 1500)
- Derin Dondurucu (Uğur, R134a)
- Hassas Terazı (Scaltec)
- Vortex (Heidolph, REAX top)
- Santrifüj (Sigma, 1-15)
- Otoklav (Hirayama, HVE-50)
- +4°C'lik soğutucu (Indesit)
- -20°C'lik Derin Dondurucu (Indesit)

- Su Banyosu (Memmert)
- Distile su cihazı (Thermo Scientific, micropure)
- Mikropipet Seti (Thermo Scientific, 0,2-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl)

3.2.2. Kullanılan Kimyasallar

- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), sodium salt (Lachema, 302430300, cat no: 30354)
- Tris-base (Merck, K39661287 907)
- Borik asit (Merck, K29935665 204)
- Brom fenol mavisi (SCP Science, B7722)
- Sükroz (Merck, 1.07651)
- Etanol absolut (Riedel- deHaän, 32221)
- Agaroz (Prona, 0945002PR)
- Etidyum Bromid (Sigma-Aldrich, E8751)
- Taq DNA Polimeraz (Thermo , # EP0402)
- 10X Taq Buffer (with KCl) (Thermo, #EP0402)
- 25 mM MgCl₂ (Thermo, #EP0402)
- 100 mM dNTP (Thermo, Deoxynucleotide set-dNTP set, 4x25 µmol, #R0181)
- Distile Su
- Nuclease Free Su (Fermentas, #R0582)
- Moleküler ağırlık standartı (GeneRuler 100 bç DNA ladder, #SM0241, Fermentas)
- Primerler:
 - **ADV F** (Hekzogen, sense)
5'-3'dizi: TGGCYWSCACNTWCTTTGACATYMG
 - **ADV R** (Hekzogen, antisense)
5'-3'dizi: GCRWAWGAHCCRTARCAKGGYTDCAT

3.2.3. Kullanılan Hazır Ticari Kitler

- High Pure Viral Nukleic Acid Kit (Roche Diagnostics Gmbit Mannheim, Almanya)

3.2.4. Kullanılan Tampon Çözeltiler

3.2.4.1. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar

- **10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok Solüsyonu pH 8.8**

- Tris Base.....108 gr
- Borik Asit.....55 gr
- EDTA.....8,3 gr

Bu malzemeler bir miktar distile su ile eritildi ve pH'sı 8,8'e ayarlandı. Daha sonra son hacim 1 litre olacak şekilde distile su eklendi. Oda ısısında muhafaza edildi.

- **Elektroforez Yürütme Tamponu (1XTBE)**

10X TBE Buffer stok solüsyonundan distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan 1X TBE tamponu elektroforez yürütme tamponu olarak elektroforez tankına konularak kullanıldı. Tanka konulan tampon haftalık olarak değiştirildi.

- **Yükleme Tamponu (20 ml için)**

- Sükroz.....4 gr.
- Brom fenol mavisi.....0,05 gr.

Tartılan kimyasallar 20 ml 1X TBE tamponunda eritildi. Oda ısısında saklandı.

- **% 1' lik Agaroz Jel**

100 ml 1X TBE Buffer içerisinde 1 gr agaroz mikrodalga fırında eritildikten sonra 10 µl Etidyum Bromid ilave edildi.

3.3. Sürüntü Örneklerinden hADV DNA' nın Tespit Edilmesi

3.3.1. Konjonktival Sürüntü Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için High Pure Viral Nucleic Acid (lot:13554700 Roche Diagnostics Gmbit Manheim, Germany) kiti kullanıldı. Ekstraksiyon aşamaları ve kullanılan çözeltilerin hazırlanması üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapıldı.

- **Çözeltilerin Hazırlanması**

- **Proteinaz K (20 mg/ml)**

- Liyofilize halde bulunan 100 mg proteinaz K, 5 ml elution buffer içinde karıştırılarak çözüldü.
 - Bu karışım, 250 µl'lik hacimlere bölünerek -20°C'de saklandı.

- **Poly (A) (4 mg/ml)**

- Liyofilize halde bulunan 2 mg poly (A) taşıyıcı RNA 0,5 ml elution buffer ile çözüldü.
 - 40 µl'lik hacimlere bölünerek -20°C'de saklandı.
 - Çalışma sırasında bu 40 µl'lik karışıma, 2 ml binding buffer [6M guanidine-HCl, 10mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (w/v), pH 4,4 (25°C)] eklendi.
 - Binding buffer ve poly (A) karışımı her çalışma sırasında yeniden hazırlandı.

- **Inhibitor Removal Buffer**

- 33 ml inhibitor removal buffer'a [5M guanidine-HCl, 20mM Tris-HCl pH 6,6 (25°C) etanol eklendikten sonraki konsantrasyonu], 20 ml saf etanol eklendi ve iyice karıştırıldı.

- **Wash Buffer**

- Wash buffer'a [2X 10 ml, 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25°C) etanol eklendikten sonraki konsantrasyonu] 40 ml saf etanol eklendi ve iyice karıştırıldı.

- **Ekstraksiyonun Aşamaları**

1. Saklanan 1 ml'lik sürüntü örnekleri 200 µl steril ependorf tüplere alındı. 2 ml binding buffer ve 40 µl Poly (A) karışımından 200 µl alınıp örneklerin bulunduğu ependorf tüplerine eklendi. Ayrıca her bir örneğin üzerine 50 µl proteinaz K (20 mg/ml) eklenip vortekslendi ve 72°C'de 10 dakika inkübe edildi.
2. İnkübasyondan sonra kapakta sıvı kalmaması için kısa süreli santrifüj edildi. Üzerine 100 µl binding buffer eklendi ve vortekslendi.
3. Kit içerisindeki toplama kapları ve filtreli tüpler iç içe geçirildi.
4. Örneklerin bulunduğu ependorf tüpündeki karışım, hazırlanan toplama kapları içerisine aktarıldı ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası, toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri yeni toplama kaplarına yerleştirildi.
6. Üzerine 500 µl inhibitor removal buffer eklenip 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri yeni toplama kapları üzerine yerleştirildi.

8. Üzerine 450 µl Wash Buffer eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri yeni toplama kapları üzerine yerleştirildi. Bu basamak toplam iki kez yapıldı.
9. Bu işlemten sonra 13000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri 1,5 ml'lik ependorf tüplere yerleştirildi.
10. Üzerine 50 µl Elution Buffer eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Ependorf tüp içindeki filtre tüpü atıldı ve daha sonra bu tüpler -20°C'de saklandı.

3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulaması

Çalışmada;

- PZR, tek bir molekül DNA'yı bile çoğaltabileceği için, reaksiyon karışımlarının DNA molekülleri ile kontamine olmasının engellenmesi için; DNA ekstraksiyonu, PZR ana karışımının hazırlanması ("master mix") ve örneklerin ana karışıma eklenmesi izole edilmiş 3 ayrı odada yapıldı.
- PZR'de ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en az düzeye indirilmesi için, ince duvarlı DNase ve RNase enzimlerinden arındırılmış steril 0,2 µl'lik PZR tüpleri (Axygen Thin-Walled PCR Tubes) kullanıldı. Solüsyonlar küçük hacimlerde tüplere bölündü.
- Aeresol bariyerli pipet uçları ve pudrasız eldivenler kullanıldı.
- Yüzeylerin dekontaminasyonu için UV ışık ve sodyum hipoklorid kullanıldı.

PZR uygulamasında, hADV genomununun "hegzogen" bölgesinin 463 bp uzunluğundaki bir bölümünü hedefleyen spesifik primer dizileri kullanılarak PZR amplifikasyonu gerçekleştirildi. PZR amplifikasyonunda kullanılan primerlerin oligonükleotid dizileri Tablo 3.1.'de gösterilmiştir [42].

Tablo 3.1. hADV "hegzogen" bölgesinin PZR amplifikasyonunda kullanılan primerlerin oligonükleotid dizileri.

Primerler**	Hedef bölge uzunluğu (bp)	Anneling derecesi (T)	Oligonükleotid diziler (5'-3')
ADV A-F (Hekzogen)	463	55°C	TGGCYWSCACNTWCTTTGACATYMG
ADV A-R (Hekzogen)			GCRWAWGAHCCRTARCAKGGYTDCAT
(M, A/C; R, A/G; W, A/T; S, C/G; Y, C/T; K, G/T; V, A/C/G; H, A/C/T; D, A/G/T; N, A/C/G/T.)			

PZR 50 µL'lik son hacimde gerçekleştirilmiş olup, her bir örnek için PZR karışımları Tablo 3.2'deki gibi hazırlanmıştır.

Tablo 3.2. hADV genomunun hegzogen bölgesinin amplifikasyonunda her bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Reaksiyon bileşenleri	Kullanılacak miktar (μL)
Distile Su	33,7
10X <i>Taq</i> Tampon	5
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP Mix (10 mM)	1
Primer 1 (ADV A-F) (100 pmol/ μL)	0,5
Primer 2 (ADV A-R) (100 pmol/ μL)	0,5
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	0,3
DNA örneği	5

Hazırlanan her bir örneğe ait ve üzerlerinde numaraları yazılı steril 0,2 μl 'lik PZR tüplerine 45'er μl konuldu. Daha sonra üzerine 5 μl DNA örneği konulup cihaza yerleştirildi ve PZR tekniği ile ısı döngü cihazında (Eppendorf Mastercycler Gradient) amplifikasyon gerçekleştirildi. Adenovirus DNA tespiti için ısı döngü cihazında PZR koşulları Tablo 3.3'teki gibi uygulandı. İşlem bittikten sonra, örnekler agaroz jel elektroforez uygulanmak üzere +4°C'deki buzdolabına kaldırıldı.

Tablo 3.3. Uygulanan amplifikasyon sıcaklık ve süreleri

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	1 dk	
Primer bağlanması (Annealing)	55	1 dk	35
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	1 dk	
Son uzama (Post elongasyon)	72	5 dk	1
Muhafaza	4	∞	∞

3.3.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

PZR ile amplifiye edilen hADV DNA'sının hegzogen bölgesini tespit etmek için agaroz jel elektroforez tekniği kullanıldı. Hazırlanan jelde yürütülen DNA'ların uzunlukları, büyüklükleri belli (100-1000 bç) DNA fragmentleri ihtiva eden moleküler ağırlık standardı ile kıyaslanarak saptandı. hADV hegzogen bölgesini hedefleyen primerler ile çoğaltılan PZR ürünlerinde 463 bç uzunluğunda ürün bantlarının görülmesi ile hADV DNA varlığı anlaşıldı.

Elektroforez tamponu olarak TBE (Tris-Borik asit-EDTA), 10X konsantre stok solüsyon şeklinde hazırlandı. Daha sonra 1X olacak şekilde distile su ile sulandırıldı ve hem tankta hem de agaroz jelin hazırlanması sırasında kullanıldı.

- **Agaroz jelin hazırlanması**

Bir erlenmayerde %1'lik agaroz jel hazırlama için, 1 gr agaroz 100 ml 1X TBE solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında homojen şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı. Buhar çıkması durduktan sonra 10 µl etidyum-bromid (0,5 µg/ml) eklendi. Erimiş haldeki etidyum-bromid ile karıştırılmış jel, tarakların yerleştirildiği jel tepsisine yavaşça döküldü. Dökme işlemi esnasında jel içinde hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat edildi. Yaklaşık 30 dakika boyunca jel katılaşıncaya kadar oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirilerek PZR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirildi. Daha önceden PZR işlemi yapılmış olan buzdolabındaki örneklerden 7 µl alınarak parafilm üzerinde 2 µl 1X TBE ile hazırlanmış yükleme tamponu (%20 sükröz veya gliserol, %0,25 brom fenol mavisini) ile iyice karıştırıldı. Daha sonra da elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağı çalıştırıldı. Kullanılan tanka 130 mA elektrik akımı verilerek örnekler 40-50 dakika boyunca yürütüldü. Yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin göçü takip ederek jelin 2/3'lük kısmına ulaştığında elektroforez işlemi durduruldu. Jeli tanktan çıkararak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-transilüminatöründe incelendi ve jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France) kayıtları yapıldı.

3.4. hADV Tiplendirilmesi

Amplifiye olan hADV heksogen PZR ürünleri, işaretli dideoksinükleotidleri içeren "Bigdye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit" (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanarak, sense ve antisense zincirleri ADV-F ve ADV-R primerleri ile "Cycle Sequence" PZR'ı yapıldı. Reaksiyon ürünlerinin elektroforez işlemi, "ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) otomatize DNA dizi analizi cihazında gerçekleştirildi. Kromatografi şeklinde elde edilen her örneğe ait sense ve antisense dizi analizi verileri CLUSTAL X versiyon 1,83 yazılım programı ile hizalandıktan sonra ve GENDOC versiyon 2.6.002 (Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility) yazılım programı ile konsensus dizi olarak kaydedildi. Konsensus diziler, PubMed-BLAST (the Basic Local Alignment Search Tool) programına yüklenerek, Gen-Bankası veri tabanında yayınlanmış referans hADV dizi verileri ile karşılaştırılarak olası hADV tiplendirilmesi yapıldı.

3.5. Filogenetik Analiz

Hasta örneklerinden 24 tanesi ve 5 referans NCBI (National Center for Biotechnology Information) dizisi (hADV4, hADV7, hADV8 , hADV37 ve hADV53) olmak üzere toplam 30

dizinin filogenetik karşılaştırması MEGA versiyon 3,1 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Dizi analizinden elde edilen “hekzon” gen bölgesi dizisi CLUSTAL X programında, referans diziler ile toplu bir şekilde hizalandıktan sonra, GENEDOC programında gerekli düzeltmeler yapıldı. Filogenetik ağaç MEGA versiyon 3,1 yazılım programı kullanılarak “Neighbor-Joining” metodu ile oluşturuldu.

NCBI dizilerinin GenBank erişim numaraları: hADV-4: KR090805.1; hADV-7: KR090819.1; hADV-D8: AB685335.1; hADV-37: AT056459; hADV-53: LC128897.1

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen verilerin özetlenmesinde kategorik veriler frekans ve yüzde cinsinden, sürekli veriler ise ortalama \pm standart, minimum ve maksimum değer cinsinden özetlemiştir. Kategorik değişkenlerin birbirleri içinde dağılımını özetlemek için ise çapraz tablo oluşturulmuştur.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. PZR sonuçları

Mersin ilinde Adenoviral şüpheli konjonktivitli hastaların prevalansını belirlemek amacıyla Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi, Göz Hastalıkları Polikliniği'ne başvuran hastalardan alınan sürüntü örnekleri PZR yöntemiyle değerlendirildi. PZR ile çalışılan toplam 60 sürüntü örneğinin 26'sında (%43) Adenovirus DNA pozitif bulundu.



Şekil 4.1. hADV-PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: Moleküler ağırlık standartı (GeneRuler 100 bp DNA ladder, #SM0241, Fermentas), 1,2,3,4,5 nolu kolonlar: hADV pozitif olarak belirlenen klinik örneklerin PZR ürünleri (~463 bp hizasında belirlenen bantlar), 6,7,8 nolu kolonlar: ADV negatif olarak belirlenen klinik örneklerin PZR ürünleri, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol.

Çalışılan 60 hastanın yaş ortalaması $35,38 \pm 16,56$ (min-max: 2-79) olarak bulundu. Cinsiyet dağılımında kadınlar 34'ünü (%56,7) erkekler 26'sını (% 43,3) oluşturmaktadır.

Pozitif bulunan 26 hastanın yaş ortalaması $30,04 \pm 13,09$ (min-max: 2-63) olarak belirlendi. Cinsiyet dağılımında hastaların 15 (%57,7)'ini kadınlar, 11 (%42,3)'ini erkekler oluşturmaktadır. Pozitif bulunan örneklerde mevsimsel dağılıma baktığımızda en yüksek pozitiflik Aralık ayında saptandı. Pozitif bulunan hastaların mevsimsel dağılımı; Şubat ayında 1 kişi (%3,8), Mayıs ayında 1 kişi (%3,8), Eylül ayında 3 kişi (%11,5), Ekim ayında 1 kişi (%3,8), Kasım ayında 6 kişi (%23,1), Aralık ayında 14 (%53,8) kişide adenoviral konjonktivit saptandı.

Tablo 4.1. hADV pozitif örneklerin aylara göre dağılımı

Aylar	Sayı	Yüzde (%)
Şubat	1	3,8
Mayıs	1	3,8
Eylül	3	11,5
Ekim	1	3,8
Kasım	6	23,1
Aralık	14	53,8
Toplam	26	100,0

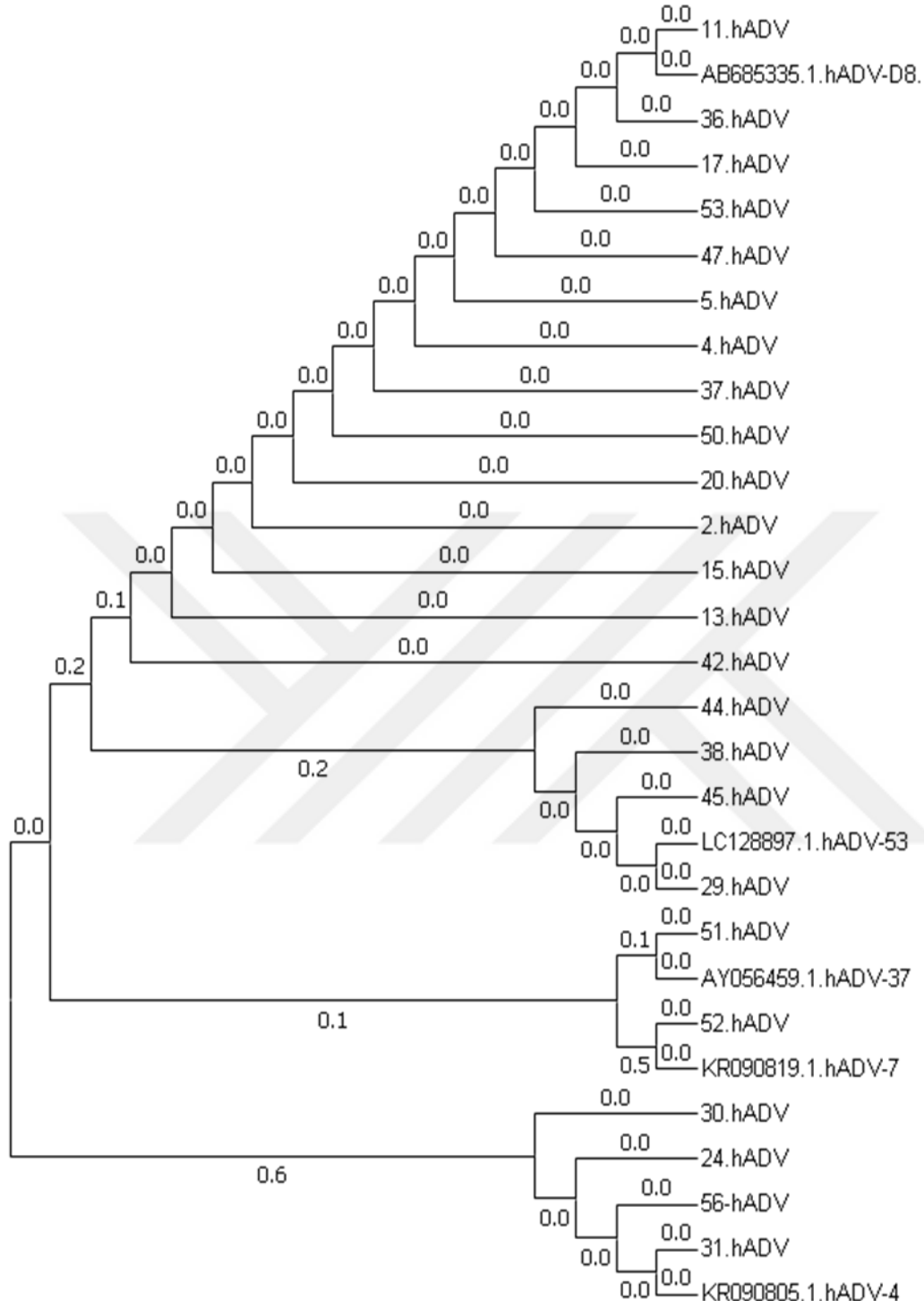
Bulunan 26 pozitif hastanın klinik tanımlarını incelediğimizde; 21 hastaya (%80,7) konjonktivit, 5 hastaya blefarit (%19,2) tanısı konmuştur.

4.1.2. Filogenetik Analiz Sonuçları

PZR pozitif bulunan 26 örneğin 24 tanesine DNA dizi analizi yapılmış olup, 2 tanesinin PZR ürünü zayıf olduğu için dizi analizi yapılamadı. Dizi analizi verilerinin filogenetik analizi ile tespit edilen tipler 14 (%58,3)'ünde hADV8, 4 (%16,7)'ünde hADV53, 4 (%16,7)'ünde hADV4, birinde (%4,2) hADV37 ve birinde (%4,2) hADV7 olarak belirlendi (Tablo 7). Belirlenen tiplerin MEGA (v3.2) programında "neighbor-joining" karşılaştırma yöntemi ile oluşturulmuş filogenetik ağaç Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Hekzogen PZR pozitif örneklerin DNA dizi analizi belirlenen hADV tipleri

AdV tipleri	Sayı (n)	Yüzde (%)
Adv tip 8	14	58,3
Adv tip 4	4	16,7
Adv tip 53	4	16,7
Adv tip 37	1	4,2
Adv tip 7	1	4,2
Toplam	24	100,0



Şekil 4.2. 24 hasta ve 5 NCBI veritabanı hADV hegzogen bölgesinin, “neighbor-joining” karşılaştırma yöntemi ile oluşturulmuş filogenetik ağaç

Örneklerin %58,3'ünde saptanan hADV8, 2014-2015 yılları arasında en sık Aralık ayında rastlanmıştır. En çok bulunan örneklerin aylara göre DNA dizi analizi sonuçları Tablo 4.3'de belirtilmiştir.

Tablo 4.3. hADV pozitif bulunan örneklerin aylara göre DNA dizi analizi sonuçları

Aylar	Sayı (n=24)	hADV tipleri					Toplam
		Yüzde (%)	hADV -D8	hADV -4	hADV -53	hADV -37	
Aralık	n	8	1	2	1	1	13
	%	%61,5	%7,7	%1,4	%7,7	%7,7	%100
Ekim	n	1	0	0	0	0	1
	%	%100	%0	%0	%0	%0	%100
Eylül	n	2	0	0	0	0	2
	%	%100	%0	%0	%0	%0	%100
Kasım	n	2	2	2	0	0	6
	%	%33,3	%33,3	33,3%	%0	%0	%100
Mayıs	n	0	1	0	0	0	1
	%	%0	%0	%0	%0	%0	%100
Şubat	n	1	0	0	0	0	1
	%	%100	%0	%0	%0	%0	%100
Toplam	n	14	4	4	1	1	24
	%	%58,3	%16,7	%16,7	%4,2	%4,2	%100

4.2. Tartışma

Adenovirüsler insanlarda farenjit, pnömoni, gastroenterit, hemorajik sistit ve keratokonjonktivit gibi enfeksiyonlara neden olabilmekte olup, hastane ve askeri birlikler gibi toplumlarda salgınlardan sorumlu tutulan virüsler arasındadır [14]. Adenovirüsler özellikle 5 yaş altı çocuklarda ve bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde hayatı tehdit eden fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilmektedir [15, 16].

Konjonktivit oftalmoloji kliniklerde en sık gözlenen bir hastalıktır. Konjonktivit ile ilgisi tanımlanmış virüslardan birisi Enterovirus genusundaki enterovirus 70 ve Koksakivirus A24'ün bir varyantı olup, hADV'ler akut konjuntivit olgularının önde gelen nedenidir [4]. Adenovirüsler, yapılan çalışmalarda da viral konjonktivit etkenleri arasında ilk sırada yer almaktadır [8, 48]. İran'da yapılan çalışmada, Göz Hastalıkları bölümüne başvuran hastaların göz sürüntü örneklerinde Herpes simplex virus 1 ve 2 (HSV-1 ve HSV-2), Varicella-Zoster virusu ve Adenovirus prevalansının konjonktivit ile ilişkisi araştırılmıştır ve 150 konjonktivitli hastada hADV prevalansı %14,6 ile viral konjonktivit etkenleri arasında ilk sırayı almıştır [24].

Ankara'da yapılan başka bir çalışmada, Göz Hastalıkları bölümüne başvuran hastaların göz sürüntü örneklerinde Adenovirus, Koksakivirus ve Enterovirus tespit edilmesi amaçlanmıştır. Konjonktival örneklerdeki ana etiyolojik ajan olarak 62 hastadan 46'sı Adenovirus (%74,2), bunu Enterovirus 70 (4/62, %6,4) ve Enterovirus 71 (4/62, %6,4), Kosakivirus 16 (1/62, %1,6) ve Kosakivirus 24 (1/62, %1,6) takip etmiştir [48].

Çalışmamızda, Eylül 2014 - Aralık 2015 yılları arasında Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Göz Hastalıkları Polikliniğine başvuran kişilerde heksogenini hedefleyen primerin kullanıldığı PZR ile konjunktival sürüntü örneklerinde hADV DNA'sının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ülkemizde akut konjonktivitli olgularda hADV prevalansının ve genotip dağılımının belirlenmesine yönelik oldukça sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda hADV'lerin konjonktivitli olgularındaki oranı %26,5-%72 arasında değişmektedir [48-51].

Çalışmaya dahil edilen 60 hastanın konjonktivit sürüntü örneğinin 26'sında hADV DNA tespit edilmiştir ve hADV DNA prevalansı %43,3 (26/60) olarak saptanmıştır. Bu oran görüldüğü gibi hADV'nin ülkemizde görülme sıklığı aralığı içinde yer almaktadır. Çalışmamız, Mersin'de adenoviral konjonktivitler konusunda yapılan ilk çalışmadır.

Yağcı ve ark. tarafından Ankara'da 2003-2004 yılları arasında klinik olarak viral konjunktivit tanısı konulan hastalarda yapılan çalışmada PZR ile %26,5 (9/34) oranında hADV pozitifliği saptandığı ve filogenetik analiz ile hADV-8 (%44,4, 4/9), hADV-3 (%3,3, 3/9), hADV-4 (%11,1, 1/9) ve hADV-B (%11,1, 1/9) saptandığı bildirilmiştir [49]. Çiçek ve ark. tarafından İzmir'de 2001 yılında çeşitli klinik örneklerin adenovirus yönünden hızlı (shell vial) hücre kültürü yöntemiyle izole edildiği ve direkt immünfloresan antikor yöntemiyle tanımlandığı çalışmada konjunktival sürüntü örneklerinde hADV PZR pozitifliğinin %16,6 (7/42) olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada hADV yönünden pozitif bulunan örneklerin heksogenini hedefleyen PZR ve sonrasında tiplendirme için dizi analizi ile araştırıldığı ve örneklerin hepsinin hADV-8 olarak tiplendirildiği belirtilmiştir [2]. Nalça-Erdin ve ark. tarafından İzmir'de 2006-2010 yılları arasında yapılan bir çalışmada ise hADV DNA'sının PZR ile %44 (213/488) oranında belirlendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada rastgele seçilen 101 örneğin dizi analizinde hADV-8 (%66,3, 67/101) ve hADV-4 (%24,7, 25/101)'ün en dominant tip olduğu ve diğer genotipler olan hADV-3, hADV-11, hADV-19, hADV-37 ve hADV-53 (%8,9, 9/101)'ün daha az görüldüğü bildirilmiştir [50]. Akçay ve ark. tarafından Ankara'da 2013-2014 yıllarında yapılan başka bir çalışmada hADV PZR pozitiflik oranı %74,2 (46/62) olarak bildirilmiş olup, genotip tespitine yönelik bir çalışma yapılmadığı bildirilmiştir [48]. Kiraz tarafından 2012 yılında yapılan tez çalışmasında da konjunktival sürüntü örneklerinde hADV DNA'sının PZR yöntemi ile %46 (23/50) oranında saptandığı bildirilmiş olup, bu çalışmada da tiplendirmenin yapılmadığı görülmüştür [51]. Ersoy ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada yenidoğan yoğun bakım

ünitesinde meydana gelen adenoviral konjonktivit salgınına ilişkin 14 olguya ait sekans analizi yapılmış olup, 14 olguda da genotip hADV8 tespit edilmiştir [52].

Adenoviridae ailesi 7 türe (A-G) ve 68 genotipe ayrılmıştır ve dünya çapında viral konjonktivit vakalarının %89'undan hADV3, hADV4, hADV7, hADV8, hADV19 ve hADV37 genotipleri sorumlu tutulmuştur [53].

Ülkemizde hADV-8'in okuler lezyonlarda en yaygın görülen genotip olduğu ve dağılımının %44,4-%100 arasında değiştiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [2, 49, 50]. Çalışmamızda PZR pozitif bulunan 26 örneğin 24'ünde direkt DNA dizi analizi yapılmış olup, 2'sinin PZR ürünü zayıf olduğu için dizi analizi yapılamamıştır. Yaptığımız çalışmada da ülkemizde yapılan diğer çalışmalar ile uyumlu olarak %58,3 (14/24) oranında en fazla hADV-8'in görüldüğü saptanmıştır. Bunu ise sırasıyla hADV-4 (%1,7, 4/24), hADV-53 (%16,7, 4/24), hADV-7 (%4,2, 1/24) ve hADV-37 (%4,2, 1/24) izlemektedir.

Birçok EKC salgını toplum kökenlidir ve kişiden kişiye solunum ve okuler sekresyonların direkt teması, parmaklarının veya kontamine oftalmik aletlerin gözle teması ile taşınmaktadır. Salgınlarda özellikle yetersiz klorlanmış yüzme havuzları veya kontamine oftalmoloji üniteleri yaygın enfeksiyon kaynağı olabilmektedir [54]. Adenoviral konjonktivit bifazik bir hastalık olup, virusun yayılmaya başladığı enfeksiyonun başlangıcındaki infektif fazı takiben 7-10 gün sonra başlayan inflamatuvar faz ile devam etmektedir. Hasta 2-3 haftaya kadar enfeksiyöz kalmaktadır [3].

Adenovirüsler dünya genelindeki bütün enfeksiyöz konjonktivit olgularının %15-70'inden sorumlu tutulduğu belirtilmektedir [4]. Suudi Arabistan'da 2002-2007 tarihleri arasında yapılan çalışmada akut viral konjunktivit şüpheli olgularda PZR ile hADV DNA'sının %89,04 oranında tespit edildiği ve pozitif örneklerin DNA dizi analizi ile en yaygın görüne tipin %67,1 oranı ile hADV-8 olduğu, örneklerin %11'inde hADV-3, %8,2'sinde hADV-37, %6,8'inde hADV-4 saptandığı ve diğer tiplerin hADV-19 (%2,7), hADV-22 (%2,7) ile hADV-14 (%1,4) olduğu belirtilmiştir [8]. Brazilya Rio de Janeiro'da 2004-2007 yılları arasında PZR ile hADV sıklığını belirlemeyi amaçlayan bir çalışmada, %60 oranında hADV pozitifliğinin saptandığı ve dizi analizi ile pozitif örneklerin %46,7'sinde hADV-19, %15,5'inde hADV-8, %6,7'sinde hADV-31'ün saptandığı ve sadece birer örnekte saptanan diğer tiplerin hADV-1, hADV-2, hADV-3, hADV-4 ve hADV-6 olduğu belirtilmiştir hADV 19, Rio de Janeiro'da bulunan baskın genotip olarak belirtilmiştir [5]. Brazilya'da 2011-2012 yıllarında yapılan başka bir çalışmada klinik olarak enfeksiyöz konjonktivit tanısı konulan hastaların göz sürüntü örneklerinde %59 (72/122) oranında hADV DNA'sının saptandığı belirtilmiş olup genotip değerlendirilmesi yapılmamıştır [4].

Yunanistan'da 2012 yılında viral konjunktivit olgularının moleküler epidemiyolojisinin nested-PZR ile değerlendirildiği bir çalışmada hADV sıklığı %83,3 (40/48) olarak bildirilmiş

olup, yapılan DNA dizi analizi ile en fazla hADV-17 (%72,5, 29/40) görüldüğü, görülen diğer tipin hADV5 (%12,5, 5/40) olduğu ve kalan örneklerin (%15, 6/40) de tiplendirilemediği bildirilmiştir [54]. Çin, Pekin’de 2011-2013 yılları arasında 18 hastanenin dahil edildiği akut konjonktivit sürveyans çalışmasında, hekzogeni PZR’ı ile %39,8 (349/876) oranında hADV pozitifliğine rastlandığı bildirilmiştir. Tüm adenoviral konjuktivit vakalarının %81,1’inden 5 tipin sorumlu olduğu belirtilmiş olup, en fazla görülen tip %18 oranı ile hADV-4 olup, bunları hADV-37 (%17,5), hADV-53 (%16,9), hADV-64 (%14,6) ve hADV-8 (%13,5) izlemektedir [55]. Batı Hindistan’da 2013-2014 yıllarında keratokonjunktivitli olgularda yapılan bir çalışmada hADV DNA pozitifliğinin %60,9 (14/23) oranında saptandığı bildirilmiş olup, hADV-8’in (%78,6, 11/14) predominant genotip olarak belirlendiği, bunu hADV-37 (%7,2, 1/14), hADV-3 (%7,2, 1/14) ve hADV-4 (%7,2, 1/14)’ün izlediği belirtilmiştir [56]. Kuzey Hindistan’da 2014-2015 yılları arasında akut konjunktivitli hastalarda yapılan bir çalışmada ise, hADV’lerin olguların %65,2 (15/23)’sinde PZR saptandığı belirtilmiş olup, 7 örneğin dizi analizi ile tiplendirildiği ve 6’sının hADV-8, 1’inin hADV-4 olarak saptandığı bildirilmiştir [57]. Kuzey Afrika, Tunus’da 2012-2013 yılları arasında yapılan bir çalışmada konjunktivitli olgularda hADV DNA’sının %65 (156/240) oranında gösterildiği, hADV-8’in genotiplendirilen örneklerin %87,6 (128/146)’sında predominant genotip olarak saptandığı ve sirküler olan diğer genotiplerin hADV-4 (%6,8, n=10), hADV-3 (%3,5, n=5), hADV-55 (%1,3, n=2) ve hADV-37 (%0,6, n=1) olduğu bildirilmiştir [58].

Mısır’da Ekim 2013-Nisan 2014 yılları arasında yapılan bir çalışmada, konjunktivitli 404 hastanın 83’ünde hADV enfeksiyonu saptanmıştır. Sekans dizi analiz sonuçlarına göre, pozitif bulunan 83 hastanın 24’ünde hADV-4, 19’unda hADV-19 saptanırken; hADV-8, hADV-37, hADV-11, hADV-3 saptanma oranları sırasıyla %8,4, %4,8, %3,6 ve %3,6 olarak tespit edilmiştir [59].

Ülkemizde yapılan kapsamlı bir çalışmada hADV’lerin okuler lezyonlarda genotip ve mevsimsel dağılım farklılığının bulunduğu, hastalığın pik yaptığı mevsimin genelde ilkbahar ayları olduğu bildirilmiştir [50]. Ancak bizim yaptığımız çalışmada Aralık ayında toplanan örneklerde daha fazla pozitiflik oranının saptandığı görülmüştür.

Diğer yandan Çin Pekin’de yapılan çalışmada adenoviral konjunktivitli olgularda, yıldan yıla sirküle olan tipin değiştiği ve hADV-37, hADV-4 ve hADV-53’ün sırasıyla 2011, 2012 ve 2013 yıllarında predominant olarak görüldüğü gösterilmiştir [55]. Epidemik keratokonjunktivit, AHK ve faringokonjunktival ateşe farklı adenovirus genotiplerinin neden olduğu ve dünya genelinde farklı sirkülayon paternlerine sahip olduğu ileri sürülmektedir. Epidemiyolojik bulgular, EKC ve AHK olgularının Asya’da kış döneminin başlangıcı ve bahar aylarında genelde sirküle olduğu, buna karşın faringokonjunktival ateşin özellikle Çin, Avustralya ve Amerika Birleşik Devletler’inde yaz aylarında sirküle olduğu belirtilmektedir [60]. Bu sebeple gelecekte

konjonktivit salgınlarnın izlenmesi için global sűrveyans sisteminin oluřturulması gűndeme gelmiřtir. Zira ABD’de genotiplendirmeye yűnelik hADV sűrveyansının amacının, hADV sirkűlasyon paterninin izlenmesi, olası salgınlr ile iliřkili sirkűle olan tiplerin tanımlanması ve dođrulanmasına yardımcı olması ve tanısall test, terapűtik ve ařıların geliřtirilmesi veya kullanılmasına yűnelik bilgi sađlaması olarak belirtilmektedir [61].

Epidemiyolojik alıřmalar, toplumda gűrűlen adenovirus genotiplerinin belirlenmesi ve salgınlarn mevsimsel űzelliklerinin saptanması konusunda veri sađlayarak salgınlara iliřkin űnlemlerin alınmasını sađlamaktadır. Dűnya verilerine baktıđımızda; ABD’de ve Japonya’da bazı ulusal sűrveyans programları bulunmaktadır [17]. Rusya’da yılda 300.000’den fazla kiřiye keratokonjonktivit teřhisi konmaktadır. En ciddi gűz enfeksiyonu olarak adenovirus D tűrűnden; hADV-8, hADV-19, hADV-37 yaygın olarak gűrűlmektedir. AdV enfeksiyonu her yař grubundaki insanları etkiler niteliktedir. Rusya’da enflamatuvar gűz hastalıkları için yılda yaklařık 18 milyon kiři gűz hastalıkları bűlűműne bařvurmaktadır. %80’i geçici gűrme kaybı ve %10-30 oranında gűrme kaybı ve kűrlűđe neden olan iltihaplı gűz hastalıkları bűlűműne bařvurmaktadır. Salgının geniř kitlelere yayılması, komplikasyonların yűksek olasılıđı (geçici veya kalıcı gűrme kaybı) ve birçok klinik sonuçlar adenoviral gűz hastalıđının medikal ve sosyal űnemini vurgulamaktadır. Halen, adenovirus enfeksiyonu için terapilerin sınırlı etkinliđi, adenovirus patojenlerine karřı seçici etkinlik gűsteren ilaçların geliřtirilmesine olan ihtiyaı belirlemektedir [62].

2012 yılı Kasım ve Aralık ayında Çin’de meydana gelen EKC salgınında 451 hastanın virusla enfekte olduđu saptanmıřtır. Bu salgına neden olan virusun hADV-56 ile iliřkili ilk salgın olduđu raporlanmıřtır [63]. Çin’de yapılan bir çalıřmada, 2016 Nisan-Kasım ayları arasında keratokonjonktivit salgını meydana gelmiř ve bildirilen 197 vakadan alınan sűrűntű űrneklerinde adenoviral konjonktivit enfeksiyonu saptanmıřtır. Filogenetik analizi yapılan pozitif űrnekler, D tűrűne ait adenovirus hADV-8, salgından sorumlu olduđu saptanmıřtır [64]. Vietnam’da yapılan bir çalıřmada, 21 konjonktival sűrűntű űrneđinin 14’űnde hADV enfeksiyonu saptanmıřtır. Elde edilen AdV DNA dizilerinin tiplendirilmesinde 11 űrnek (%78,6) hADV-8, 2 űrnek (%14,3) hADV-3 ve 1 űrnek (%7,1) hADV-37 olarak saptanmıřtır [65].

Solumum yolu etkeni olan virusların semptomları oldukça benzerdir. Antiviral tedavi gereksinimi olan risk grubu hastalarda tedavinin yűnlendirilmesi, gereksiz antibiyotik kullanımının űnlenmesi ve ařı uygulaması olan virusların koruyucu antikor geliřtirip geliřtirmediklerinin belirlenmesi gibi nedenlerle viral tanıya gerek duyulmuřtur [16]. Adenoviral konjonktivit tanısı genellikle semptom ve klinik bulgulara dayanılarak yapılır [9]. Gűnűműzde birçok viroloji laboratuvarında enfeksiyonun dođrulanması amacıyla hűcre kűltűrű yűntemleri ve molekűler yűntemler uygulanmaktadır. Gűnűműzde virusların tanısında birçok mikrobiyoloji laboratuvarında kantitatif sonuç veren real-time PZR yűntemi yaygın olarak

kullanılmaktadır [15]. Bu yöntem hızlı sonuç verdiği ve düşük miktarda da olsa genetik materyali tespit edebildiği için erken dönemde tedavi ve korunma önlemlerinin alınması açısından önemini korumaktadır. Örnekteki viral yük miktarı kültür ile tespit edilemeyecek kadar düşükse veya virus non-enfeksiyöz özellikteyse viral genomun amplifikasyonu ve belirlenmesi yüksek duyarlılık sağlamaktadır [8]. Çalışmamızda hADV genotiplerinin belirlenmesi için kullandığımız direkt DNA dizi analizi, oldukça etkili, doğru ve hızlı bir yöntemdir.



5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamız, Mersin ilindeki adenoviral göz enfeksiyonları ile ilgili olarak yapılmış olan ilk çalışmadır.

Eylül 2014 - Aralık 2015 yıllarına ait 60 hastanın incelendiği çalışmada adenoviral konjonktivitinin prevalansı hegzogeni PZR'ı ile %43,3 olarak belirlenmiştir. hADV DNA pozitif örneklerin DNA dizi analiz sonucunda hADV-8'in %58,3 oranı ile en baskın genotip olduğu saptanmıştır. Saptanan diğer genotipler ise hADV-4 (%16,7), hADV-53 (%16,7), hADV-7 (%4,2), hADV-37 (%4,2) olarak belirlenmiştir. Çalışma populasyonunda tespit edilen bu oran dünyanın diğer bölgelerinde bildirilen prevalans oranına benzerdir.

Çalışmada genotiplerin belirlenmesi için kullanılan direkt DNA dizi analizi, oldukça etkili, doğru ve hızlı bir yöntemdir.

Ülkemizde okuler lezyonlara neden olan hADV'lerin major tiplerini ortaya koymayı amaçlayan daha ileri başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

Yaptığımız çalışma hADV genotiplerinin moleküler epidemiyolojine büyük katkıda bulunacaktır ve ulusal epidemiyolojik verinin birikmesi açısından son derece önemlidir.

KAYNAKLAR

- [1]. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A., *Tıbbi Mikrobiyoloji*. 6. Baskı.; Ankara, 2010; p 509.
- [2]. Çiçek, C.; Sanlıdağ, T.; Akçalı, S.; Sayan, M.; Yalaz, M.; Metin, D.Y., Molecular typing of adenoviruses isolated from clinical specimens by PCR and DNA sequencing methods. *Mikrobiyoloji Bulteni* **2012**, 46, (4), 607-13.
- [3]. Jhanji, V.; Chan, T. C.; Li E.Y.; Agarwal, K.; Vajpayee, R. B., Adenoviral keratoconjunctivitis. *Surv Ophthalmol* **2015**, 60, (5), 435-4.
- [4]. Pinto, R. D.; Lira, R. P.; Arieta, C. E.; Castro, R. S.; Bonon, S. H., The prevalence of adenoviral conjunctivitis at the Clinical Hospital of the State University of Campinas, Brazil. *Clinics (Sao Paulo)* **2015**, 70, (11), 748-50.
- [5]. Maranhao, A. G.; Soares, C. C.; Albuquerque, M. C.; Santos, N., Molecular epidemiology of adenovirus conjunctivitis in Rio de Janeiro, Brazil, between 2004 and 2007. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **2009**, 51, (4), 227-9.
- [6]. Doğan, M.; Ağca, A., Eltutar, K., Outbreak of Acute Hemorrhagic Conjunctivitis in Istanbul in 2010. *Clinical Features. İstanbul Tıp Derg - İstanbul Med J* **2012**, 13, (2), 74-78.
- [7]. Taşkapılı, M.; Yılmaz, M., Pediatric conjunctivitis. *Türk Ped Arfl* **2012**, 47, 240-6.
- [8]. Tabbara, K. F.; Omar, N.; Hammouda, E.; Akanuma, M.; Ohguchi, T.; Ariga, T.; Tagawa, Y.; Kitaichi, N.; Ishida, S.; Aoki, K.; Ishiko, H.; Ohno, S., Molecular epidemiology of adenoviral keratoconjunctivitis in Saudi Arabia. *Molekuler vision* **2010** 24, (16) 2132-6.
- [9]. Saygı, G., *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. 1.Baskı.; Ankara, 1999; p 807-13.
- [10]. Culver, C. A., Adenovirus triggers reorganization of vimentin containing intermediate filaments resulting in the perinuclear movement of cPLA₂ and suppression of prostaglandin production, Graduate Thesis, North Carolina State University, ABD, 2007.
- [11]. Enders, J.F.; Bell J.A.; Dingle J.H.; Francis T. et al. Adenoviruses: group name proposed for new respiratory-tract viruses. *Science (Washington)*, **1954**, 124, 119-20.
- [12]. Zuckerman, A. J., *Principles and practice of clinical virology*. 5th ed.; John Wiley & Sons: England, 2009; p 343-61.
- [13]. Davison, A. J.; Benko, M.; Harrach, B., Genetic content and evolution of adenoviruses. *J.Gen.Virol.* **2003**, 84, (11), 2895-2908.
- [14]. Buckwalter, S.P., et al. Real Time Qualitative PCR for 57 Human Adenovirus Types from Multiple Specimen Sources. *J Clin Microbiol.* **2012**, 50, (3), 766-71.
- [15]. Ghebremedhin B., Human adenovirus: viral pathogen with increasing importance. *European Journal of Microbiology and Immunology* **2014**, 4, (1), 26-33.
- [16]. Echavarria, M., Adenoviruses in Immunocompromised Hosts. *Clinical Microbiology Reviews*, **2008**, 704-715.
- [17]. Thounaojam, A. D.; Barurao, M.A.; Anukumar, B., A case report of fatality associated with adenovirus type 2 infection in a young child, Kerala. *Case Study Case Rep* 2015, 5, 105-108.
- [18]. Russell, W. C., Adenoviruses: Update on structure and function. *J. Gene. Virol.* 2009, 90, 1-2
- [19]. Heemskerk, B., Adenovirus infection and immunity in children after stem cell transplantation, Graduate Thesis, Leiden University, Netherlands, 2005.
- [20]. Wayne, M. M. Y.; Sing, C. W., Anti-Viral drugs for human adenoviruses. *Pharmaceuticals* 2010, 3, (10), 3343-3354.
- [21]. Saha, B.; Wong, C. M.; Parks, R. J., The Adenovirus genome contributes to the structural stability of the virion. *Viruses* 2014, 6, 3563-3583.
- [22]. Ampuero J.S.; Ocana V., et al. Adenovirus respiratory tract infections in Peru. *PLoS ONE* 7 2012, (10): e46898.
- [23]. Lion T., Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clinical microbiology reviews* 2014, 27, (3), 441-462.
- [24]. Sohrabi, M.; Goodarz, Z.; Saberfar, E.; Lashini, H.; The Prevalence of viral conjunctivitis in patients who referred to eye specialist hospitals in Tehran, Iran. *Iranian Journal of Ophthalmology* 2014, 26, (1), 29-32.

- [25]. Teoh, D. L.; Reynolds, S., Diagnosis and management of pediatric conjunctivitis. *Pediatric emergency care* 2003, 19, (1), 48-55.
- [26]. Chodosh, J.; Astley, R.A., et al. Adenovirus keratitis: a role for interleukin 8. *IOVS* 2000, 41,(3), 783-9.
- [27]. Meyer-Rüsenberg, B.; Loderstadt, U.; Richard, G.; Kaulfers, P.; Gesser, C., Epidemic keratoconjunctivitis. *Dtsch Arztebl Int* 2011, 108, (27), 475-80.
- [28]. Heerden J. V.; Ehlers, M. M.; Grabow, W.O.K., Detection and risk assessment of adenoviruses in swimming pool water. *J Appl Microbiol* 2005, 99, 1256-64.
- [29]. Chhabra, P., et al. *Infect Dis. Etiology of viral gastroenteritis in children <5 years of age in the United States, 2008-2009.* 2013, 208, (5), 790-800.
- [30]. Şener, K.; Yapar, M., et al. Solunum yolu enfeksiyonu olan askerlerin nazofarengeal örneklerinde adenovirus varlığının ve alt gruplarının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2009, 43, 91-101.
- [31]. Liddle, O.L.; Samuel, M. I., et al. Adenovirus urethritis and concurrent conjunctivitis: a case series and review of the literature. *Sex Transm Infect* 2015, 91, 87-90.
- [32]. Ramírez, J., et al. Fever, haematuria, and acute graft dysfunction in renal transplant recipients secondary to adenovirus infection: Two Case Reports. *Case reports in nephrology, Mexico*, 2013.
- [33]. Saltoğlu N. Toplum kökenli üriner sistem enfeksiyonlarına yaklaşım. *Sempozyum Dizisi No:61* 2008, s. 139-150.
- [34]. Ayelet Shauer M.D., et al. Acute Viral Myocarditis: Current Concepts in Diagnosis and Treatment. *IMAJ* 2013, 15, 180-185.
- [35]. Güleç, S. G.; Urgancı, N.; Erdem, E. Akut enfeksiyonların karaciğere etkisi. *Ş.E.E.A.H. Tıp Bülteni* 2010, 44, (4), 181-7.
- [36]. Rocholl, C.; Gerber, K.; Daly, J.; Pavia, A.T., et al. Adenoviral infections in children: the impact of rapid diagnosis. *Pediatrics* 2004, 113, 51-56.
- [37]. Öztürk, O., et al., Birinci basamakta adenovirüs enfeksiyonları. *Klinik Tıp Aile Hekimliği Dergisi* 2014, 6, (3), 21-5.
- [38]. Maranhão, A.G., et al. Molecular epidemiology of adenovirus conjunctivitis in Rio de Janeiro, Brazil, between 2004 and 2007. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2009, 51, (4), 227-9.
- [39]. Van Rij, G.; Klepper, L.; Peperkamp, E., et al., Immune electron microscopy and a cultural test in the diagnosis of adenovirus ocular infection. *Br J Ophthalmol* 1982, 66, 317-9.
- [40]. Terletskaia-Ladwig E., et al. Laboratory approaches to the diagnosis of adenovirus infection depending on clinical manifestations. *Infection* 2007, 35, 438-443.
- [41]. Rodríguez, P.H.; Ramirez, A. G., Polymerase Chain Reaction. *InTech*,2012; p 157.
- [42]. Lam, W.Y.; Yeung, A.C., et al. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol.* 2007, 45, (11), 3631-40.
- [43]. Lin, B. A., et al. Use of oligonucleotide microarrays for rapid detection and serotyping of acute respiratory disease-associated adenoviruses. *Journal Of Clinical Microbiology* 2004, 3232-39.
- [44]. Brooks, Geo F., Janet S. Butel, and Stephen A. Morse, *Medical Microbiology*. 25th ed.; Institutional Press: United States, 2006; p 295-303.
- [45]. Doornum, G. J. J. V.; Jong, J. C. De., Rapid shell vial culture technique for detection of enteroviruses and adenoviruses in fecal specimens: comparison with conventional virus isolation method. *Journal Of Clinical Microbiology* 1998, 2865-2868.
- [46]. Engler, H. D.; Preuss, J., Laboratory diagnosis of respiratory virus infections in 24 hours by utilizing shell vial cultures. *Journal Of Clinical Microbiology* 1997, 2165-67.
- [47]. Lee, J. H., Chun, J.K., et al. Identification of Adenovirus, Influenza Virus, Parainfluenza Virus, and Respiratory syncytial virus by two kinds of multiplex polymerase chain reaction (PCR) and a shell vial culture in pediatric patients with viral Pneumonia. *Yonsei Med J* 2010, 51, (5), 761-67.
- [48]. Akçay, E., et al. Molecular identification of viral agents associated with acute conjunctivitis: a prospective controlled study. *Braz j Infect Dis.* 2017,21, (4), 391-395.

- [49]. Yağci, R., et al. Molecular identification of adenoviral conjunctivitis in Turkey. *Eur J Ophthalmol.* 2010, 20, (4), 669-74.
- [50]. Erdin, B.N., et al. A 5-year Study of Adenoviruses causing conjunctivitis in Izmir, Turkey. *Journal of Medical Virology* 2015, 87, 472-477.
- [51]. Kiraz, A., et al. Investigation of Adenoviruses in patients with conjunctivitis by various methods. *Eur J Basic Med Sci* 2013 3, (4) 83-89.
- [52]. Ersoy, Y.; Otlu, B.; Turkcuoglu, P., et al. Outbreak of adenovirus serotype 8 conjunctivitis in preterm infants in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect.*2012, 80, 144-149.
- [53]. Sundaramoorthy, R., et al. Outbreak of Adenovirus serotype 8 keratoconjunctivitis in Puducherry, South India: a molecular epidemiological study. *J Infect Dev Ctries* 2016, 10, (4), 449-452.
- [54]. Balasopoulou, A., et al. A molecular epidemiological analysis of adenoviruses from excess conjunctivitis cases. *BMC ophthalmology* 2017, 17, (1), 51.
- [55]. Li, J., et al. Adenovirus-associated acute conjunctivitis in Beijing, China, 2011-2013. *BMC Infect Dis.* 2018, 18, (1), 135.
- [56]. Gopalkrishna, V.; Ganorkar, N.N.; Patil, P.R., Identification and molecular characterization of adenovirus types (HAdV-8, HAdV-37, HAdV-4, HAdV-3) in an epidemic of keratoconjunctivitis occurred in Pune, Maharashtra, Western India. *J Med Virol.* 2016, 88, (12), 2100-105.
- [57]. Singh, M.P., et al. Molecular epidemiology of circulating human adenovirus types in acute conjunctivitis cases in Chandigarh, North India. *Indian J Med Microbiol.* 2018, 36,(1), 113-115.
- [58]. Fedaoui, N., et al. Molecular detection and characterization through analysis of the hexon and fiber genes of Adenoviruses causing conjunctivitis in Tunisia, North Africa. *J Med Virol.* 2017, 89, (2), 304-312.
- [59]. Garout, M.A., et al. molecular epidemiology of Adenovirus strains genotypes among patients with acute follicular conjunctivitis. *American Journal of Epidemiology and Infectious Disease*, 2016, 4, (2), 18-21.
- [60]. Zhang, L., et al. Virology and epidemiology analyses of global adenovirus-associated conjunctivitis outbreaks, 1953-2013. *Epidemiol Infect.* 2016, 144, (8), 1661-72.
- [61]. Binder, A. M., Biggs, H. M., Haynes, A. K., Chommanard, C., Lu, X., Erdman, D. D., ... & Gerber, S. I. (2017). Human Adenovirus Surveillance—United States, 2003–2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 66(39), 1039.
- [62]. Nikitenko, N. A.; Speiseder, T.; Lam, E.; Rubtsov, P. M.; Tonaeva, K. D.; Borzenok, S. A., Dobner, T., et al. Regulation of human adenovirus replication by RNA interference. *Acta Naturae* 2015, 7, (3), 100-107.
- [63]. Huang, G., et al. Outbreak of epidemic keratoconjunctivitis caused by human Adenovirus type 56, China, 2012. *PLoS ONE* 2014, 9, (10) e110781. doi:10.1371/journal.pone.0110781.
- [64]. Lei, Z., et al. Outbreaks of epidemic keratoconjunctivitis caused by human adenovirus type 8 in the Tibet Autonomous Region of China in 2016. *PloS one* 2017, 12, (9), e0185048.
- Jin, X.H.; Okamoto, Y.; Morishita, J.; Tsuboi, K.; Tonai, T.; Ueda, N. Molecular epidemiology of adenoviral conjunctivitis in Hanoi, Vietnam. *Am J Ophthalmol* 2006; 142, 1064-6.
- [65]. Jin, X.H.; Okamoto, Y.; Morishita, J.; Tsuboi, K.; Tonai, T.; Ueda, N. Molecular epidemiology of adenoviral conjunctivitis in Hanoi, Vietnam. *Am J Ophthalmol* 2006; 142, 1064-6.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Aslıhan BEKÇİ

Doğum Tarihi : 08.03.1986

E-mail : asligormuser@mersin.edu.tr

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Çukurova Üniversitesi	2005-2009
Yüksek Lisans	Tıbbi Mikrobiyoloji	Mersin Üniversitesi	2013-2018
Doktora			

Görevler :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Bilgisayar İşletmeni	Eğitim Fakültesi	2016

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

- 1.
- 2.
- 3.